

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA BIOCHEMIE**



**Studium exprese jaderného receptoru *nhr-97* v  
*Caenorhabditis elegans***

**Study of expression of the nuclear receptor *nhr-97* in  
*Caenorhabditis elegans***

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Kristýna Boušová

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Školitel: MUDr. Marta Kostrouchová, CSc.

Praha 2012

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 25.7. 2012

Kristýna Boušová

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala MUDr. Martě Kostrouchové, CSc. za odborné vedení, vstřícnost a ochotu při vypracovávání diplomové práce v Laboratoři molekulární biologie a genetiky na Ústavu buněčné biologie a patologie 1.LF UK. Děkuji Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za cenné rady a připomínky při zpracování této práce a za záštitu, kterou mi poskytla.

Děkuji také pracovnímu kolektivu Laboratoře molekulární biologie a genetiky za pomoc při řešení praktických a odborných problémů a příjemné pracovní prostředí, zvláště Hance Prouzové za provedení mikroinjekcí a Františku Behenskému za provedení metody kvantitativní PCR.

Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

## Abstrakt

Jaderné hormonální receptory (NHR) patří mezi důležité transkripční faktory, které regulují vývoj a metabolismus u velké části živočichů. *Caenorhabditis elegans* obsahuje 284 jaderných receptorů, což je neobvykle velké množství oproti receptorům nalezeným u *Drosophila melanogaster* (18) a u člověka (48). Patnáct z těchto receptorů *C. elegans* má homologní strukturu s receptory *D. melanogaster* a se savci. Zbylých 269 NHR jsou specifické pouze pro hlístice a patří do skupiny tzv. doplňkových jaderných receptorů (SupNRs), jejichž evolučním předchůdcem je HNF4 - důležitý transkripční faktor u člověka. V této práci jsme popsali jaderný hormonální receptor *nhr-97*, jehož exprese a funkce dosud nebyly studovány. Gen je kódován v genomu *C. elegans* a patří mezi SupNRs. *Nhr-97* tvoří dvě isoformy A a B, jejichž exprese je v tkáních *C. elegans* odlišná. Lokalizace exprese genu *in vivo* byla určena pomocí transgenních linií exprimujících *nhr-97::GFP*. Pro isoformu A byla exprese *nhr-97* lokalizována v neuronech v oblasti hltanu a v oblasti ocásku, ve střevě a v hypodermis, pro isoformu B v hltanu, v neuronech okolo korpusu hltanu, v hlavové mesodermální buňce a v análním svěrači. Exprese *nhr-97* během vývoje *C. elegans* byla stanovena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Zjistili jsme, že mRNA *nhr-97* *C. elegans* je ve všech stádiích exprimována zhruba ve stejné míře, nicméně v embryonálním stádiu *C. elegans* je exprese nejnižší. Funkce *nhr-97* *C. elegans* byla studována metodou posttranslačního umlčování genu na úrovni RNA interference. Jedinci s deaktivovaným genem vykazovali pouze 9 % embryonální letalitu a zároveň jsme nepozorovali žádné fenotypové změny během vývoje *C. elegans*. Pomocí bioinformatických metod jsme v promotorové oblasti isoformy B *nhr-97* našli vazebnou sekvenci TGTTTGC pro transkripční faktor *pha-4*/FoxA. Jeho inhibicí na posttranskripční úrovni metodou RNA interference jsme zjistili 38% embryonální letalitu a 8% larvální letalitu v transgenní linii *nhr-97::GFP* P2B. Zároveň došlo ke ztrátě exprese *nhr-97::GFP* v hltanu. Naše výsledky potvrdily, že *pha-4*/FoxA reguluje expresi *nhr-97* v hltanu *C. elegans*. Porovnáním aminokyselinových sekvencí *nhr-97* s jeho paralogními receptory pomocí bioinformatické metody, jsme zjistili podobnost receptorů v oblasti domény pro vazbu DNA, která je charakteristická svou konzervovaností a zároveň jsme charakterizovali sekvenci domény P-box jako CHGCKCFFWR.

## Abstract

Nuclear hormone receptors (NHR) are important transcription factors that regulate development and metabolism in the large group of animals. *Caenorhabditis elegans* contains 284 nuclear receptors, which is unusually large amount compared to receptors of *Drosophila melanogaster* (18) and humans (48). 15 receptors of the *C. elegans* have homologous receptor structure with receptors of *D. melanogaster* and mammals. The remaining 269 NHR are specific to nematodes and belong to the group of supplementary nuclear receptors (SupNRs), the evolutionary precursor of the HNF4 - an important transcription factor in humans. In this work we describe the nuclear hormone receptor *nhr-97* *C. elegans*, whose expression and function have not yet been studied. The gene is encoded in the genome of *C. elegans* and is among SupNRs. *Nhr-97* consists of two isoforms A and B, whose expression in *C. elegans* tissues is different. Localization of gene expression *in vivo* was determined using lines expressing *nhr-97::GFP*. For the A isoform expression of *nhr-97::GFP* was localized in neurons in the pharynx and the tail, in the intestine and hypodermis, in isoform B in the pharynx, in neurons around the corpus of pharynx, the head mesodermal cell and in anal sphincter. *Nhr-97* expression during development of *C. elegans* was determined by quantitative polymerase chain reaction (PCR). We found that *nhr-97* mRNA is expressed in all stages at about the same extent, and the lowest expression is in the embryonic stage. *Nhr-97* function in *C. elegans* was studied by posttranslation silencing of the gene by RNA interference. Individuals with an inhibited gene function showed only 9% embryonic lethality while we didn't observe any phenotypic changes in development of *C. elegans* larvae. Using bioinformatics methods, we have found binding sequence for the transcription factor TGTTTGC *pha-4*/FoxA in the promoter region of *nhr-97* isoform B. The inhibition of *pha-4* on posttranscriptional level by RNA interference caused 38% embryonic lethality and 8% of larval lethality in transgenic line *nhr-97::GFP* P2B and the loss of expression of *nhr-97::GFP* in the pharynx. Our results confirmed that *pha-4*/FoxA regulates expression of *nhr-97* in *C. elegans* pharynx. By comparing amino acid sequences of *nhr-97* with its paralog receptors using bioinformatic methods, we found similarity of receptors in the binding domain for DNA, which is characterized by its conservation. At the same time we have characterized the sequence of P-box domain as CHGCKCFFWR.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>10</b>
1.1	Jaderné hormonální receptory	10
1.1.1.	Regulace genové exprese	10
1.1.1.1.	Regulace transkripce signálními molekulami: hormony	12
1.1.2.	Vazebné motivy proteinů pro vazbu DNA	13
1.1.3.	Struktura jaderných hormonálních receptorů	14
1.1.3.1.	Doména pro vazbu DNA	15
1.1.3.2.	Ligandy jaderných hormonálních receptorů	17
1.1.3.3.	„Sirotčí“ receptory	17
1.1.4.	Jaderné hormonální receptory v <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
1.2	Transkripční faktor <i>pha-4</i> /FoxA	19
1.3	<i>Caenorhabditis elegans</i> jako účinný nástroj vývojové biologie	20
1.3.1.	Životní cyklus <i>C. elegans</i>	21
1.3.2.	Kultivace <i>C. elegans</i>	23
1.3.3.	Anatomie <i>C. elegans</i>	23
1.3.3.1.	Epiteliální systém <i>C. elegans</i>	23
1.3.3.2.	Nervový systém <i>C. elegans</i>	24
1.3.3.3.	Svalový systém <i>C. elegans</i>	24
1.3.3.4.	Trávicí systém <i>C. elegans</i>	25
1.3.4.	Genetika <i>C. elegans</i>	26
1.4	Zelený fluorescenční protein	26
1.4.1.	Struktura a funkce zeleného fluorescenčního proteinu	26
1.4.2.	Použití zeleného fluorescenčního proteinu v molekulární biologii	28
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a Metody</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiál</b>	<b>30</b>
3.1.1.	Biologický materiál	30
3.1.2.	Biologická média	30
3.1.3.	Klonovací vektory	31
3.1.4.	Enzymy	32
3.1.5.	Primery	33
3.1.6.	Chemikálie	33

3.1.7. Přístroje a vybavení .....	35
<b>3.2 Metody.....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Studium exprese <i>nhr-97</i> v modelovém organismu <i>C. elegans</i> pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) .....	36
3.2.1.1. Isolace genomické DNA <i>C. elegans</i> .....	37
3.2.1.2. Příprava navržených konstruktů promotorů <i>nhr-97</i> z gDNA <i>C. elegans</i> .....	37
3.2.1.3. Příprava transgenních linií <i>C. elegans</i> a studium exprese <i>nhr-97</i> .....	39
3.2.2. Kvantitativní PCR <i>nhr-97</i> .....	39
3.2.2.1. Izolace RNA <i>C. elegans</i> .....	39
3.2.2.2. Ošetření RNA DNase .....	40
3.2.2.3. Reversní transkripce RNA.....	40
3.2.2.4. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) .....	41
3.2.3. Inhibice <i>nhr-97</i> metodou RNA interference .....	43
3.2.3.1. Příprava konstruktů cDNA pro RNAi <i>nhr-97</i> .....	43
3.2.3.2. Příprava dsRNA.....	45
3.2.3.2.1. Linearizace plasmidové DNA .....	45
3.2.3.2.2. Transkripce DNA in vitro.....	45
3.2.3.2.3. Příprava dvouvláknové RNA.....	46
3.2.3.3. Mikroinjekce dsRNA a studium vlivu RNAi na organismus <i>C. elegans</i> .....	46
3.2.4. Indukovaná exprese <i>nhr-97</i> v organismu <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	47
3.2.4.1. Příprava konstruktů cDNA pro indukovanou expresi <i>nhr-97</i> .....	47
3.2.5. Molekulárně biologické metody .....	49
3.2.5.1. Kultivace <i>C. elegans</i> .....	49
3.2.5.2. Metoda PCR .....	49
3.2.5.3. Fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace DNA.....	50
3.2.5.4. Elektroforetické stanovení DNA na agarosovém gelu .....	51
3.2.5.5. Restrikční štěpení DNA.....	51
3.2.5.6. Odstranění fosfátových skupin klonovacích vektorů .....	52
3.2.5.7. Klonování insertů do vektorů .....	52
3.2.5.8. Transformace kompetentních buněk teplotním šokem.....	53

3.2.5.9.	Isolace plasmidové DNA.....	53
3.2.5.10.	Stanovení koncentrace DNA .....	53
3.2.5.11.	Stanovení sekvence DNA.....	54
3.2.5.12.	Příprava transgenních linií <i>C. elegans</i> mikroinjikováním.....	54
3.2.5.13.	Mikroskopie transgenních linií <i>C. elegans</i> .....	54
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>55</b>
4.1	Charakterizace genu <i>nhr-97</i> <i>C. elegans</i> .....	55
4.2	Lokalizace exprese <i>nhr-97</i> v tkáních <i>C. elegans</i> pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) .....	55
4.2.1.	Příprava fúzního plasmidu s navrženými promotory <i>nhr-97</i> .....	55
4.2.2.	Detekce exprese <i>nhr-97</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP PA C. elegans</i> pomocí zeleného fluorescenčního proteinu .....	57
4.2.3.	Detekce exprese <i>nhr-97</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP P2A C. elegans</i> pomocí zeleného fluorescenčního proteinu .....	61
4.2.4.	Detekce exprese <i>nhr-97</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP P3A C. elegans</i> pomocí zeleného fluorescenčního proteinu .....	65
4.2.5.	Detekce exprese <i>nhr-97</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP PB C. elegans</i> pomocí zeleného fluorescenčního proteinu .....	66
4.2.6.	Detekce exprese <i>nhr-97</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP P2B C. elegans</i> pomocí zeleného fluorescenčního proteinu .....	67
4.3	Stanovení exprese mRNA <i>nhr-97</i> v jednotlivých vývojových stádiích <i>C. elegans</i> pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR).....	70
4.3.1.	Příprava cDNA z jednotlivých vývojových stádií <i>C. elegans</i> pro qPCR .....	70
4.3.2.	Expres mRNA <i>nhr-97</i> isoformy A+B v jednotlivých vývojových stádiích <i>C. elegans</i> .....	71
4.3.3.	Expres mRNA <i>nhr-97</i> isoformy A v jednotlivých vývojových stádiích <i>C. elegans</i> .....	74
4.4	Studium vlivu inhibice <i>nhr-97</i> metodou RNA interference provedenou na divokém typu N2 <i>C. elegans</i> .....	76
4.5	Studium vlivu inhibice <i>pha-4</i> metodou RNA interference provedenou v transgenní linii <i>nhr-97::GFP P2B</i> .....	78
4.5.1.	Nalezení vazebného místa v promotorové oblasti <i>nhr-97</i> isoformy A a B pro DNA vazebnou doménu <i>pha-4</i> bioinformatickými metodami.....	78
4.5.2.	Provedení metody RNA interference <i>pha-4</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP P2B C. elegans</i> .....	79
4.5.3.	Vyhodnocení dat získaných během RNA interference <i>pha-4</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP P2B C. elegans</i> .....	80
4.5.4.	Změny fenotypu a exprese <i>nhr-97</i> způsobené inhibicí <i>pha-4</i> v transgenní linii <i>nhr-97::GFP P2B C. elegans</i> .....	82



4.6	Studium změn fenotypu <i>C. elegans</i> způsobených indukovanou expresí <i>nhr-97</i> ..	84
4.7	Bioinformatická analýza aminokyselinové sekvence <i>nhr-97</i> s jeho paralogními receptory.....	86
<b>5</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>98</b>

# 1 Úvod

## 1.1 Jaderné hormonální receptory

Jaderné hormonální receptory (z *angl.* Nuclear Hormone Receptors, NHR) jsou důležitými transkripčními faktory v celé řadě biologických regulačních procesů probíhajících u mnohobuněčných organismů. Mezi tyto procesy patří především kontrola metabolismu, homeostáza, pohlavní odlišení obratlovců, metamorfóza hmyzu a obojživelníků a také se podílejí na obraně živočichů proti xenobiotikům [1, 2, 3].

Tyto receptory interagují se souborem koaktivátorů a korepresorů, které napomáhají stimulaci či inhibici exprese cílových genů [4, 5, 6].

NHR jsou charakterizovány schopností regulovat genovou expresi na základě vazby ligandů. Po jejich navázání dojde ke konformační změně receptoru a k aktivaci transkripce. Bez navázání ligandu se receptory chovají většinou jako represory transkripce cílových genů. Ligandy jsou malé hydrofobní molekuly, hormony, metabolity a xenobiotika [7, 8].

NHR se mohou vázat na promotory ve formě monomerů, dimerů nebo heterodimerů [2, 3].

Většina NHR, které byly identifikované u mnohobuněčných živočišných organismů jsou evolučně zachované a patří mezi šest základních skupin jaderných receptorů NR 1 až NR 6 [9, 10].

### 1.1.1. Regulace genové exprese

Regulace genové exprese hraje velmi důležitou roli především u mnohobuněčných organismů, u nichž se z velké části podílí na vzniku různých typů buněk – nervových, svalových, krevních, epiteliálních a dalších. Tato diferenciací je způsobena shromažďováním odlišných druhů RNA a proteinů v různých buňkách. Regulace exprese genů může být realizována v různých stádiích od DNA až k proteinu. Rozlišujeme čtyři potenciální regulační body:

- transkripce - kdy a jak často dojde k přepisu genu
- úpravy a sestřih primárního transkriptu
- translace - výběr přepisované mRNA
- aktivace či inaktivace vzniklých proteinů

U většiny genů probíhá regulace exprese na úrovni transkripce a u ní bývá nejčastěji regulován iniciační krok. Transkripce každého genu je kontrolována regulační sekvencí nacházející se před konkrétním genem, která může být u eukaryot dlouhá i několik tisíc párů bazí. Tato regulační sekvence se nazývá promotor. Promotor obsahuje iniciační místo, kde transkripce začíná, a oblast TATAAAA před iniciační oblastí, na kterou se váže RNA polymerasa. Oblast TATAAAA, na kterou se váže TBP (z *angl.* TATAbox Binding Protein) způsobující ohyb DNA a zpřístupnění místa pro vazbu RNA polymerasy, se nazývá TATA box. RNA polymerasa po navázání na DNA putuje po tomto templátovém vlákně a syntetizuje RNA.

Regulační sekvence řídí, zda gen bude či nebude exprimován. Tyto sekvence bývají rozpoznávány regulačními proteiny, které se na ně navazují. Vazba proteinu na cílovou sekvenci DNA probíhá právě díky specifickým rysům daného úseku dvojšroubovice. Spojení proteinu a DNA tvoří většinou vazby iontové, vodíkové a hydrofobní interakce. Vzhledem k jejich dostatečnému množství je vazba velmi pevná. Zvýšení specifity a pevnosti vazby podporuje také často vazba proteinu ve formě dimerů, tetramerů, či heterodimerů.

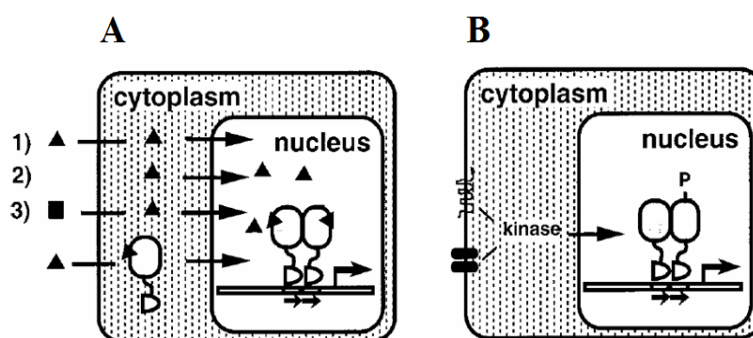
Indukce, neboli aktivace genů a represe, neboli inhibice genů jsou procesy ovlivňované vazbou proteinů. Proteiny, které aktivují expresi genů, se označují jako induktory (pozitivní regulační mechanismy), naopak proteiny, které expresi inhibují jsou represory (negativní regulační mechanismy). Princip vazby induktoru i represoru na DNA je založen na určité, pro daný protein specifické vazbě. Transkripční faktory jsou specifické svými dvěma vlastnostmi, dokáží rozpoznat cílové sekvence nacházející se v promotorech, které mají vliv na konkrétní cílové geny a váží se na DNA [11, 12].

### 1.1.1.1. Regulace transkripce signálními molekulami: hormony

U mnohobuňečných eukaryot může probíhat signalizace mezi různými typy buněk prostřednictvím sekrece hormonu. Z tohoto hlediska jsou důležité především dva typy hormonů – steroidní a peptidové.

Steroidní hormony jsou malé, v tucích rozpustné molekuly odvozené od cholesterolu, proto mohou bez obtíží procházet lipidovou vrstvou buněčné membrány. Příkladem těchto hormonů jsou estrogen, progesteron, testosteron, glukokortikoidy a jiné. Po vstupu hormonů do buňky dochází k jejich interakci s cytoplazmatickými, či jadernými receptory a vzniklý komplex hormon-receptor interaguje s DNA, kde působí jako transkripční faktor regulující expresi určitých genů.

Peptidové hormony předávají signály do buňky přes membránové receptory, které po interakci s hormonem změní svou konformaci a ta vede k dalším změnám specifických bílkovin uvnitř buňky. Signál je takto přenesen až k jádru buňky. Tento způsob přenosu signálu je označován jako signální transdukce a účastní se ho například insulin, somatotropin, prolaktin, atd (Obr.1), [12].



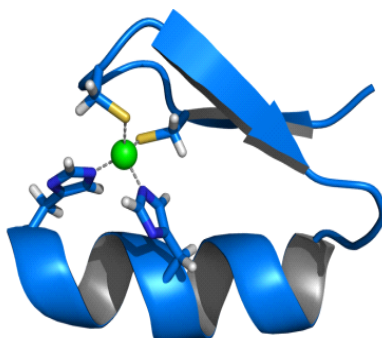
Obr.1: Mechanismus působení jaderných receptorů. (A) Ligand může být tvořen třemi různými způsoby: 1) Aktivní ligand nebo hormon je syntetizován v běžném endokrinním orgánu a poté vstupuje do buňky, 2) ligand může být vytvářen z prekursoru či prohormonu uvnitř cílové buňky, 3) ligand může být metabolisován (syntetizován) uvnitř cílové buňky. (B) Druhým způsobem je přenos signálu zajištěn navázáním ligandu vně buňky na membránový receptor, který mění svou konformaci, a na vnitřní straně membrány takto ovlivňuje další proteiny účastnící se signální kaskády. Přenos signálu mezi proteiny je většinou založen na fosforylaci (fosforylační proteiny-kinasy). Převzato z [13].

### 1.1.2. Vazebné motivy proteinů pro vazbu DNA

#### Struktura „zinkového prstu“

„Zinkový prst“ je krátký proteinový strukturní motiv, který koordinuje vazbu jednoho či více iontů zinku. Patří mezi nejvýznamnější a nejčastější interakční moduly pro DNA, RNA, proteiny a malé molekuly. Důležitost role „zinkových prstů“ ve vazbě proteinu na DNA byla prokázána mutační analýzou [12].

Motiv vzniká, když dva cysteiny v jedné části polypeptidu a dva histidiny (Cys2/ His2; u transkripčních faktorů často struktura Cys2/ Cys2) v další části polypeptidu společně navážou zinkový ion. Peptidový úsek mezi těmito dvěma páry aminokyselin poté vyčnívá z těla proteinu jako prst. Vazebné místo pro zinek je dále stabilizováno hydrofobními aminokyselinami tyrosinem, tryptofanem a leucinem a každý prst si zachovává  $\beta\beta\alpha$  strukturu. „Zinkový prst“ je nejčastější vazebnou doménou DNA v lidském genomu [11, 14, 15].



Obr.2: Struktura proteinového motivu - „zinkový prst“. Převzato z [16].

#### Struktura „leucinového zipu“

Mezi další významné strukturní motivy proteinů patří struktura „leucinového zipu“. Tento motiv se často vyskytuje v DNA vazebné doméně transkripčních faktorů. Je tvořen dvojicí antiparalelních vláken  $\alpha$ -helixu, které obsahují repetitivní úseky leucinových zbytků. Tyto leucinové zbytky mezi sebou vytvářejí interakce a dávají vzniknout proteinovému dimeru [17].

## **Struktura „helix-otáčka-helix“**

Strukturní motiv „helix-otáčka-helix“ je podobný struktuře „leucinového zipu“. Tvoří ji dva  $\alpha$ -helixy a krátký úsek aminokyselinových zbytků, který vytváří „otáčku“. Jeden helix je menší a zodpovídá především za dimerizaci helixů a druhý se účastní vazby na DNA pomocí vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí [11, 12].

### **1.1.3. Struktura jaderných hormonálních receptorů**

Jaderné receptory patří mezi jedny z nejrozšířenějších transkripčních faktorů, které se vyskytují se u mnohobuněčných živočichů. Jsou charakteristické svou strukturou, která je tvořená pěti hlavními proteinovými doménami, typickými právě pro jaderné receptory [7].

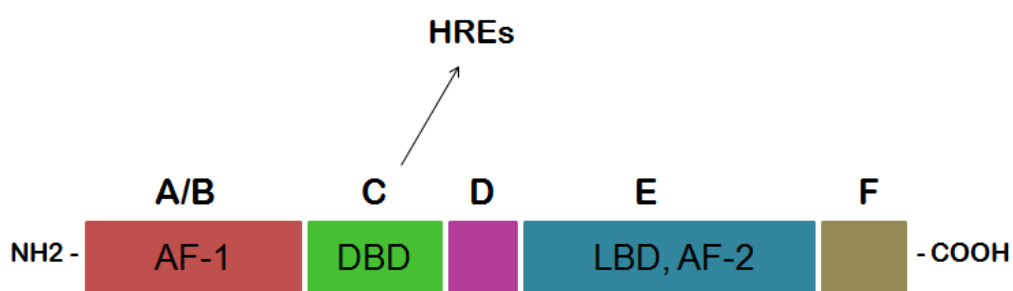
N-terminální A/B doména nemá stálou strukturu. Tato doména obsahuje aktivační funkci 1 (AF-1), která je autonomní a přispívá k interakci s transkripčními faktory [6]. Tato oblast může také interagovat se specifickými buněčnými kofaktory [2, 18].

Doména pro vazbu DNA tvoří nejzachovalejší úsek proteinu (doména C; DBD, z *angl.* DNA Binding Domain), který rozeznává specifické sekvence v promotorech cílových genů. Tyto sekvence se nazývají elementy hormonální odezvy (HREs, z *angl.* Hormone Response Elements, Obr.3) a zprostředkovávají hormonálně indukovanou expresi. Jsou umístěny blízko genů, které regulují, a slouží k navazování komplexu hormon-receptor, který následně stimuluje transkripci. Síla transkripční odezvy závisí na počtu přítomných HREs, čím více elementů, tím se ke každému z nich kooperativně váže komplex hormon-receptor a transkripce se přímo úměrně násobí počtem HREs [12, 18]. Jaderné receptory jsou členěny do podskupin právě podle struktury jejich vazebné domény pro DNA [19].

Doména D (tzv. závěsná část), jejíž struktura následuje po doméně pro vazbu DNA, nemá stálou strukturu, je velice variabilní a umožňuje DBD vázat některé receptory jako dimery, či heterodimery. Napomáhá také vazbě na DNA tím, že umožňuje DBD části receptoru se otáčet. D doména může interagovat také s některými koaktivátory a korepresory [4].

Doména vážící ligandy (doména E; LBD, z *angl.* Ligand Binding Domain) má stálou strukturu stejně jako DBD a společně s ní také patří mezi nejvýznamnější domény jaderného receptoru. Zodpovídá za rozeznání a navázání příslušného ligandu na receptor. Vazbou ligandu na receptor dojde ke změně konformace proteinu a tím k jeho aktivaci (kap. 1.1.3.2. Ligandy jaderných hormonálních receptorů). Takto aktivovaný receptor se váže na promotorovou oblast příslušného regulovaného genu [2].

C-terminální doména nazývaná F má vysoce variabilní doménu, jejíž funkce nebyla doposud vysvětlena [2].

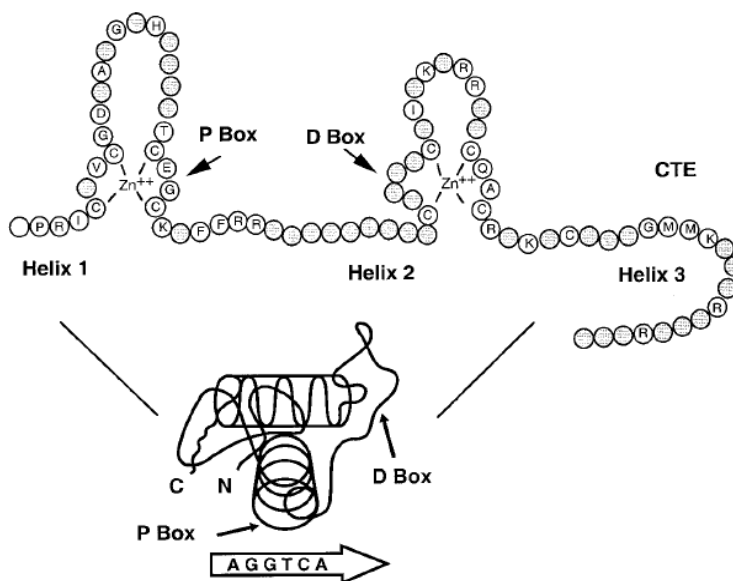


*Obr.3: Schéma jaderného hormonálního receptoru. Typický jaderný hormonální receptor je tvořen několika funkčními doménami. Variabilní N-terminální A/B doména obsahuje AF-1 transaktivační doménu nezávislou na vazbě ligandu, která přispívá k interakci s transkripčními faktory. HREs slouží k navozování komplexu hormon-receptor, který následně stimuluje transkripci. Konzervovaná doména pro vazbu DNA (C oblast) je tvořená dvěma proteinovými strukturami zinkového prstu a zodpovídá za rozeznání a vazbu DNA (kap.1.1.3.1. Doména pro vazbu DNA). Oblastí D (závěsná část) pokračuje struktura receptoru do oblasti E (AF-2), která je důležitá pro jadernou translokaci komplexu, vazbu ligandu a dimerizaci. C-terminální část receptoru, F doména, má variabilní délku. Vytvořeno podle [20].*

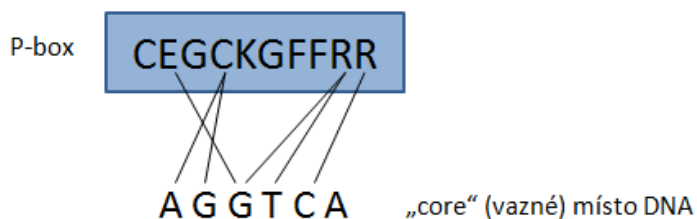
### 1.1.3.1. Doména pro vazbu DNA

Nejprozkoumanější částí jaderných receptorů je centrálně umístěná vazebná doména pro DNA, která obsahuje vysoce zachované strukturní elementy. Tato doména je tvořena dvojicí polypeptidů ( $\alpha$ -helixů) mající motiv „zinkového prstu“, z nichž každý je tvořen

čtyřmi cysteiny. Na konci prvního zinkového prstu se vyskytuje doména P-box, která rozpoznává a váže HREs. Je tvořená několika aminokyselinami, které interagují s šesti páry bází AGGTCA, nazývanými také jako „core“ (vazné) místo DNA. Jaderné receptory tvořící homodimery či heterodimery využívají pro vazbu na DNA dvě kopie sekvence AGGTCA. Jednotlivé HRE jsou definovány vzdáleností a orientací „core“ míst v promotoru cílových genů a pomáhají rozlišit vazebnou specifitu mezi NHR se stejnými doménami P-box. Doména D-box přispívá k dimerizační vlastnosti NHR. V C-terminální části DBD je oblast CTE (z *angl.* C Terminal Extension) obsahující strukturní element A-box, který zprostředkovává kontakt receptoru s DNA v 3' směru (Obr.4), [7, 18, 21].



Obr.4: DNA vazbená doména jaderných receptorů. Schematické zobrazení dvou zinkových prstů a C terminálního rozšíření (CTE). V každém zinkovém prstu koordinují 4 cysteiny zinečnatý ion. Helix 1 obsahuje doménu P-box a helix 2 doménu D-box. Převzato z [13].



Obr.5: Kontakt domény P-box receptoru s „core“ (vazným) místem DNA. Šipky znázorňují tvorbu vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami domény P-box a specifickými páry bází AGGTCA. Vytvořeno podle [7].



#### **1.1.3.2. Ligandy jaderných hormonálních receptorů**

Navázáním příslušného ligandu na receptor dojde k jeho aktivaci, která je potřebná pro vazbu na DNA. Ligandem je většinou hydrofobní molekula, která snadno vstupuje do buňky difusí přes membránu. Přenos ligandu z cytoplasmy do jádra je umožněn specifickými vazebnými proteiny, jejichž identifikace byla umožněna objevem radioaktivně značených ligandů [22]. V jádře se molekula váže na receptor, mění jeho konformaci a tím je receptoru umožněna vazba pomocí DBD na cílovou sekvenci v DNA [2].

Ligandy NHR jsou většinou hydrofobní molekuly, kterými jsou například steroidní hormony: glukokortikoidy, mineralokortikoidy, estrogeny, androgeny, vitamin D3, ekdysone, oxysteroly a žlučové kyseliny, retinové kyseliny (všechny trans a 9-cis isoformy), thyroïdní hormony, mastné kyseliny, prostaglandiny a leukotrieny [23, 24].

#### **1.1.3.3. „Sirotčí“ receptory**

U mnohých jaderných hormonálních receptorů jejich vazebné ligandy nejsou známy, a proto bývají označovány jako „sirotčí“ (z *angl.* orphan nuclear receptors). Není jasné, zda tyto receptory pracují na základě mechanismu bez vazby ligandu, či mají specifické ligandy, které jsou získávány z metabolitů a prostředí [25, 26].

#### **1.1.4. Jaderné hormonální receptory v *Caenorhabditis elegans***

Genom volně žijících Hád'átek obecných (*Caenorhabditis elegans*) obsahuje 284 genů pro jaderné hormonální receptory. Některé z těchto receptorů sdílí homologní sekvence s receptory některých obratlovců a hmyzu. Srovnávací analýzou sekvencí NHR *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* a savců se zjistilo, že 15 receptorů *C. elegans* má vysoce konzervovanou strukturu s receptory ostatních analyzovaných živočichů. Zbylých 269 NHR *C. elegans* jsou specifické pouze pro hád'átko a patří do skupiny tzv. doplňkových jaderných receptorů, jejichž evolučním předchůdcem je HNF4 - důležitý transkripční faktor člověka [26, 27]. Bylo prokázáno, že *nhr-23* a *nhr-25* jsou receptory důležité pro vývoj epidermis [8, 28, 29]; *fax-1* a *unc-55* jsou důležité pro nervový vývoj [30, 31]; *sex-1* ovlivňuje sexuální rozlišení [32]; *nhr-67* a *nhr-85* jsou důležité pro správný vývoj a

funkci vulvy, *nhr-8* napomáhá toxinové rezistenci, *nhr-41* a *nhr-85* jsou důležité během tvorby zvláštního vývojového stádia *C. elegans* tzv. „dauer“ larvy a *nhr-6* během ovulace [10].

Jaderné receptory se vyskytují u nematod v nezvykle velké míře, a to vzhledem k tomu, že u nich došlo k rozsáhlému rozvoji a diverzifikaci rodiny genů NHR. Tyto geny nám poskytují důležitý pohled na evoluční vývoj organismů a biologii nematod a také přinášejí nové pohledy na mechanismy funkcí jaderných receptorů [7, 27].

Vzhledem ke specifitě a zachovanosti každé domény P-box daného receptoru jsou NHR u *C. elegans* tříděny do tříd právě podle sekvence aminokyselin domény P-box. V Tab. 1 vidíme rozdělení receptorů do tříd I-IV. Třídy NHR I-III byly rozděleny podle sekvence společné pro tyto receptory (viz 2. řádek Tab. 1). Receptory, jejichž sekvence se zcela neshodují, ale jsou alespoň podobné v pozicích 3,5,6 (pozice 1 a 3 jsou stabilní, jedná se o cysteiny koordinující Zn), jsou začleněny do podskupin „další“ tříd I-III. Třída IV zahrnuje receptory, které nelze zařadit ani do jedné z prvních 3 skupin. Číslo uvedené v závorce za sekvencí domény P-box udává počet receptorů s touto sekvencí u *C. elegans* [7].

*Tab.1: Třídy jaderných homonálních receptorů C. elegans. Třídy jsou rozděleny podle podobnosti sekvencí aminokyselin jejich domén P-box. Aminokyselinová sekvence domény P-box nhr-97 se nachází pod číslem 24. v políčku označeném zeleně. Údaj v závorce za sekvencemi udává počet NHR C. elegans, které mají danou sekvenci domény P-box. Vytvořeno podle [7].*

<b>Třída I</b>	<b>Třída II</b>	<b>Třída III</b>	<b>Třída IV</b>
<b>CxGCKGFFRR</b>	<b>CxACKMFFRR</b>	<b>CxACAFFRR</b>	<b>Další</b>
1.CNGCKGFFRR(10)	36.CNACKMFFRR(11)	53.CRACAFFRR(75)	89.CRSCNAFFRR(5)
2.CEGCKGFFRR (4)	37.CDACKMFFRR (4)	54.CAACAFFRR (7)	90.CFRCNVFFRN(1)
3.CFGCKGFFRR (3)	38.CFACKMFFHR (3)	55.CKACAFFRR (7)	91.CLSCITFFRR (1)
4.CDGCKGFFRR (2)	39.CEACKMFFRR (2)	56.CGACAFFRR (2)	92.CNSCDLFFRR(1)
5.CYGCKGFFRR (2)	40.CDACKMFFKR (1)	57.CIACAFFRR (2)	93.CNSCTEAFFDV(1)
6.CEGCKGFFKR (2)	41.CDACKMFYRR(1)	58.CSACAFFRR (2)	94.CSACCSFFRR(1)
7.CVGCKGFFRR (1)	42.CFACKMFFRR (1)	59.CEACAFFRR (1)	95.CSACGSFLRR(1)
	43.CFACKMFFYR (1)	60.CLACAFFRR (1)	
<b>Další</b>	44.CNACKMFIRR (1)	61.CRACAFFRI (1)	
8.CNGCKTFFRR(19)	45.CSACKMFFAR (1)	62.CRACAFFRL (1)	
9.CKGCKTFFRR (5)	46.CSACKMFFRR (1)	63.CRACAFFRQ (1)	

10.CLGCIFFRR (5)	47.CSACKMFFRR (1)	64.CRACAFYRR (1)	
11.CESCKAFFRR (3)	48.CYACKMFFRR (1)	65.CTACAAFFRR (1)	
12.CNGCKAFFRR(3)			
13.CLGCKTFFRR (2)	<b>Další</b>	<b>Další</b>	
14.CLGCTVFFRR (2)	49.CNACKIFFRR (4)	66.CRACAVFFRR (5)	
15.CDGCAGFFKR(1)	50.CNACGTFFRR (1)	67.CRSCAAFFRR (5)	
16.CDGCGRGFFKR(1)	51.CNACKLFFRR (1)	68.CRACSAFFRR (4)	
17.CDGCSCFFKR (1)	52.CNSCKIFFRR (1)	69.CMACASFFRR (1)	
18.CEGCKSFFKR (1)		70.CSACSAFFRR (3)	
19.CESCKGFFKR (1)		71.CAACSAFFRR (2)	
20.CFGCSGFFRR (1)		72.CGACSAFFRR (2)	
21.CGGCKIFFSR (1)		73.CSACASFFRR (2)	
22.CGGCSQFFRK(1)		74.CTACASFFGR (2)	
23.CGHCKAFFRR(1)		75.CTACASFFRR (2)	
24.CHGCKCFFWR(1)		76.CAACGAFFRR (1)	
25.CHGCKSFFRR (1)		77.CGACASFFRR (1)	
26.CIGCLVFFRR (1)		78.CLACASFFRR (1)	
27.CKDCKTFFRR(1)		79.CLSCAAFFRR (1)	
28.CLGCILFFRR (1)		80.CNACASFFRR (1)	
29.CNGCKSFFRR (1)		81.CPACSAFFRR (1)	
30.CNGCSGFFRR (1)		82.CRACAEFFRR (1)	
31.CPSCKGFFRR (1)		83.CRACASFFRR (1)	
32.CRGCNAAFFRR(1)		84.CRACGEFFRR (1)	
33.CRGCTAFFRR (1)		85.CRACGVFFRR (1)	
34.CRGCTSFFRR (1)		86.CRACTAFFRR (1)	
35.CVGCKTFFRR(1)		87.CRGCAAFFRR (1)	
		88.CRPCAFFRR (1)	

## 1.2 Transkripční faktor *pha-4*/FoxA

*Pha-4* patří do skupiny transkripčních faktorů, nazývajících se Fox (z *angl.* Forkhead box), které se vyskytují u všech mnohobuněčných živočichů. Hrají důležitou roli při buněčné smrti, detoxikaci reaktivních forem kyslíku, opravách DNA, zástavě buněčného cyklu, metabolismu glukosy, udržování homeostázy, atd. Mnoho Fox proteinů hraje důležitou roli během embryonálního vývoje organismu [33]. První člen rodiny Fox (FoxA) byl původně identifikován u *Drosophila melanogaster* [34].

Skupina Fox proteinů je charakteristická svou zachovalou strukturou DBD proteinu a tvoří ji více než 100 členů, které jsou klasifikovány do skupin FoxA až FoxR na základě podobnosti sekvence proteinu. DBD FoxA proteinů, stejně jako ostatních členů Fox rodiny, je tvořena proteinovým motivem helix-otáčka-helix. Tento motiv obsahuje po stranách páry smyček, proto bývá také přezdíván jako „okřídlený helix“ (z *angl.* winged

helix). DBD zprostředkovává základní kontakty v hlavním žlábků DNA, tyto vazebné interakce bývají specifické pro každou z podskupin Fox proteinů. Členové podskupiny FoxA se přednostně váží na sekvenci TRTTKRY (R=A/G, K=G/T, Y=C/T). Analýza vybraných sekvencí DNA pro vazbu DBD *pha-4*/FoxA naznačuje, že ne všechny verze sekvence TRTTKRY odpovídají vazbě *pha-4 in vivo*. Jednou z nejčastěji vyskytujících se sekvencí vázajících DBD *pha-4 in vivo* u *C. elegans* je TGTTCG [35].

Aktivita transkripčního faktoru *pha-4* (z *angl.* pharynx defective-4), patřícího do skupiny FoxA, je nezbytná pro vývoj hltanu a střeva v raném stádiu embryogeneze *C. elegans*. Další důležitou roli plní v regulaci dlouhověkosti při omezení stravy [36]. Inhibicí genu v živém organismu dochází k zástavě vývoje hlístice v embryonálním či larválním stádiu L1 a larvy postupně umírají [37, 38, 39].

Růst a vývoj hltanu *C. elegans* závisí na koordinaci exprese genů zprostředkovaných *pha-4* v kombinaci s dalšími, většinou neznámými, transkripčními faktory. Důkazem, že mezi tyto faktory patří i skupina jaderných hormonálních receptorů je gen, který ovlivňuje vývoj svalů hltanu *C. elegans daf-12/NHR*. *Pha-4* a *daf-12* společně reagují na různé vývojové a fyziologické změny [40].

Většina, možná všechny geny exprimované v různých typech buněk hltanu a v různých vývojových stádiích *C. elegans* jsou aktivovány přímo *pha-4*. Zároveň několik objevených transkripčních faktorů může působit i ve spojení s tímto proteinem [40].

### **1.3 *Caenorhabditis elegans* jako účinný nástroj vývojové biologie**

V roce 1965 poprvé použili biologové, mezi nimi i Sydney Brenner, *Caenorhabditis elegans* (*Hádátka obecná*) jako modelový organismus pro studium molekulární a vývojové biologie [41]. Tento organismus začali používat pro jeho četné výhody, mezi něž patří malá velikost, snadná laboratorní kultivace, rozmnožování, krátký životní cyklus, kompletní nervový systém a především perspektivní potenciál pro genetickou analýzu [42]. V dnešní době patří mezi největší přednosti *C. elegans* detailní znalost vývojové linie všech jeho buněk a znalost všech genů po sekvenaci genomu [56]. V první fázi buněčného

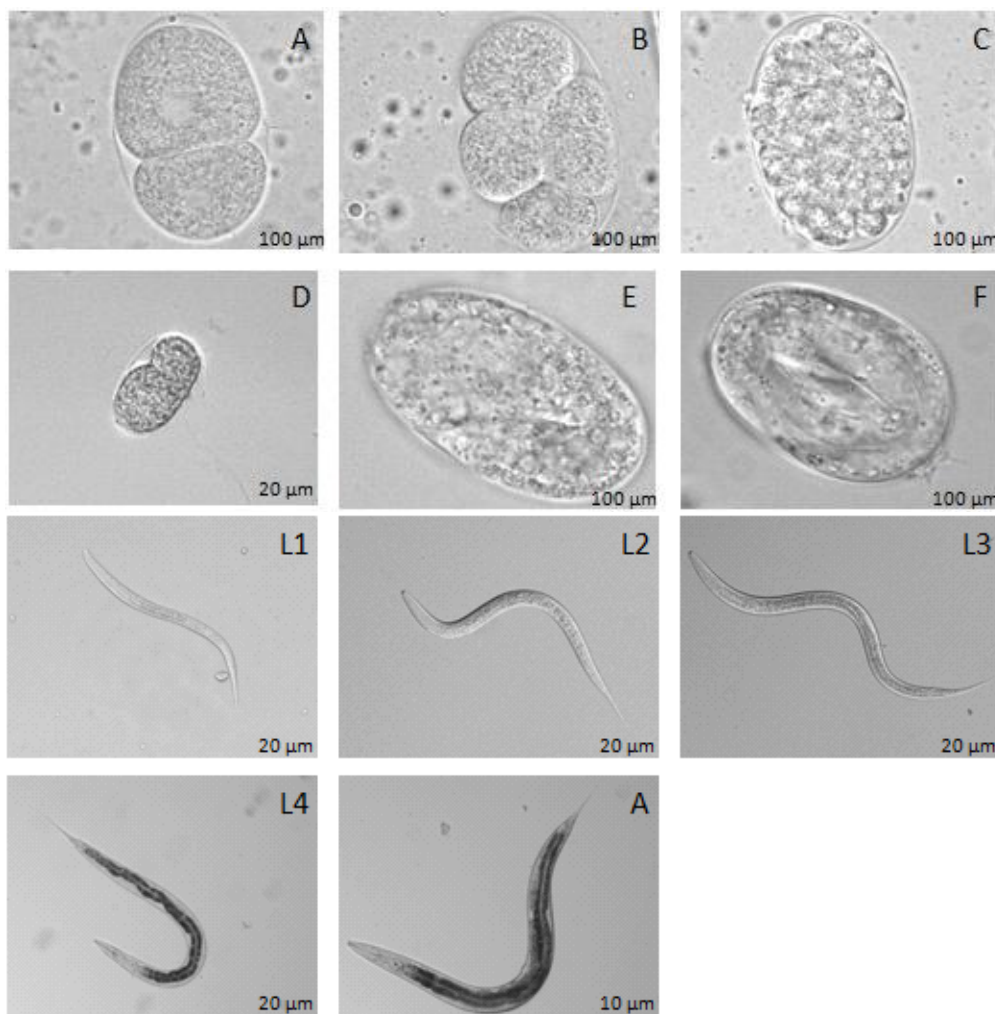
dělení vzniká šest kmenových buněk: AB, E, MS, C, D a P<sub>4</sub>, které se dále dělí podle přesně daného schématu, díky němuž dávají vzniknout budoucím orgánům [43].

*Caenorhabditis elegans* patří mezi půdní nematoda, která se vyskytuje v přírodě prakticky po celém světě. Má dvě pohlaví, hermafrodity rozmnožující se samooplozením a samce, kteří představují pouhé půl procento celé populace. V přírodě se *C. elegans* živí bakteriemi a houbami, v laboratoři se pro jeho kultivaci používají bakterie *Escherichia coli*. Dospělý jedinec dosahuje délky okolo jednoho milimetru [41].

### 1.3.1. Životní cyklus *C. elegans*

Životní cyklus *C. elegans* za standardních laboratorních podmínek trvá přibližně 3 dny. Vývoj nematoda prochází šesti stádii, které můžeme rozdělit do dvou etap: embryogeneze, během které vzniká embryo, a postembryonální vývoj zahrnující larvální stadia L1, L2, L3, L4 a dospělého jedince, kterým je vývoj nematoda završen. Dospělá hlístice žije přibližně 14 dnů a během svého života naklade zhruba 300 embryí [44].

Takzvaná „dauer“ larva je zvláštní vývojové stádium, do kterého se nematoda vyvine, pokud se změní životní podmínky na nepříznivé – například hladovění hlístice. Dochází k útlumu metabolismu a zastavení reprodukce. Do tohoto stadia přechází larva L2 a po obnovení příznivých životních podmínek se vyvíjí do postembryonálního stadia L4 a dále pokračuje ve vývoji. V tomto stadiu může *C. elegans* přežít až několik měsíců [44].



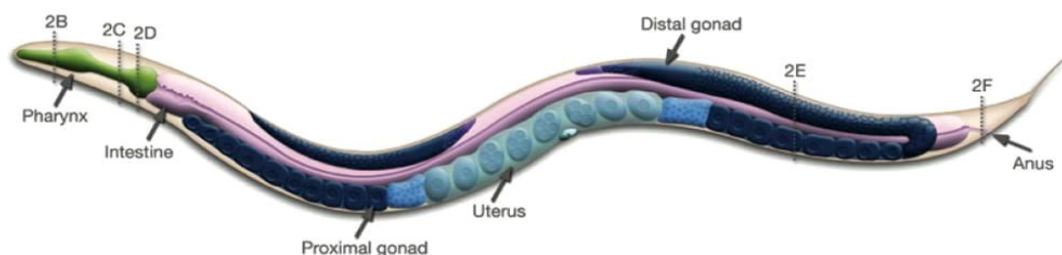
Obr.6: Životní cyklus *C. elegans*. Obrázky A – F označují vývoj embrya. Embryogenze do stádia na obrázku C probíhá v děloze (uterus), dále se embrya vyvíjí (obr. D-F) již mimo tělo nematoda. Obr. A - dvoubuněčné embryo, (cca 40 min. po oplození); obr. B - čtyřbuněčné embryo, (cca 75 min.); obr. C – Gastrula, (cca 200 min.); D – stadium fazole (bean stage), (cca 460 min.); E - stadium dvojího ohnutí (2. fold stadium), (cca 490 min.); F – stadium trojího ohnutí (3. fold stadium), (cca 550 min.). Písmena L1-L4 označují larvální stadia nematoda L1, L2, L3 a L4 . Na posledním obr. A je dospělý jedinec. Při fotografování byl použit Nomarského hranol. Převzato z [45].

### 1.3.2. Kultivace *C. elegans*

Kultivace *Caenorhabditis elegans* v laboratorních podmínkách je velmi snadná. Nematoda jsou krmena bakteriemi *Escherichia coli* kmenem OP50 na Petriho miskách s růstovým médiem pro kultivaci nematod (NGM, z *angl.* Nematode Grow Medium). Divoký kmen je *C. elegans* druh Bristol, kmen N2 [41]. Nezbytnou složkou NGM je cholesterol, který hlístice běžně získávají z prostředí. Životní cyklus nematod závisí na teplotě použité během kultivace. Z oplozeného embrya se vyvine dospělý jedinec za 3,5 dne při teplotě 20°C. Čím je teplota nižší, tím je vývoj *C. elegans* delší. Jak již bylo zmíněno, za nepříznivých vnějších podmínek přechází hlístice do latentního stádia, tzv. „dauer“ larvy [46, 47].

### 1.3.3. Anatomie *C. elegans*

*Caenorhabditis elegans* patří mezi mnohobuněčné organismy. Tělo dospělého jedince je tvořeno přibližně 1000 somatických buněk. Hlístice mají válcovitý tvar těla, který se na konci zužuje. Tělo se skládá z vnější a vnitřní trubice. Vnější trubici tvoří kutikula, epidermis, svaly, neurony a vylučovací systém. Vnitřní trubice je tvořena hltanem (pharynx), střevem (intestine) a u dospělého jedince proximálními a distálními gonádami (Obr.7). Dospělý hermafrodit má reprodukční systém tvořený sadou dvou vaječníků a dvou spermaték, které vedou do vejcovodu a dále do dělohy (uteru), [41].



Obr.7: Anatomie *Caenorhabditis elegans*, dospělý hermafrodit. Převzato z [48].

#### 1.3.3.1. Epiteliální systém *C. elegans*

Vnější povrch těla *C. elegans* tvoří hypodermis. Tato epiteliální tkáň vytváří základní tvar těla nematod, tvoří kutikulu, odvádí apoptické buňky fagocytózou a slouží také k ukládání

živin. Mnoho buněk tvoří vícejaderná syncytia, která vznikají splynutím buněk během vývoje *C. elegans*.

Epiteliální tkáň *C. elegans* se skládá z hypodermis a specializovaných buněk, kterými jsou švové buňky (z *angl.* seam cells), mezifázové buňky a ostatní buňky, např. buňky ocasního bodce. Jak již bylo zmíněno, zvláštními typy hypodermálních buněk jsou tzv. mezifázové buňky, které pokrývají vnější otvory těla jako jsou rty (tzv. aralde buňky, buňky bukální epitelium), vulva, vylučovací pór a konečník.

Všechny tyto komponenty hypodermis tvoří jednu vrstvu epiteliálních buněk, které pohromadě drží díky pevným adhezním spojmům. Apikální plochy buněk jsou vázány na kutikulu a jejich bazální povrch je pokryt bazální laminou [49].

#### **1.3.3.2. Nervový systém *C. elegans***

Nervový systém *C. elegans* je jednoduchý a neměnný. Dospělí hermafrodité mají 302 neuronů, které jsou organizovány do ganglií v hlavě a ocasu. Ganglium v hlavě je tvořené centrálním nervovým kruhem, který komunikuje přes interneurony se somatickými nervovými vlákny v dorsální a ventrální části těla nematoda. Podél bočních stran těla se ještě vyskytují malá ganglia a senzorové receptory. Neurony hermafroditů komunikují prostřednictvím 6400 chemických synapsí, 900 tzv. těsných spojení (přenáší informace elektricky) a 1500 neuromuskulárních spojení [50, 51].

#### **1.3.3.3. Svalový systém *C. elegans***

U *C. elegans* existují dva hlavní typy svalů: mnohonásobná sarkomera (příčně pruhované svalstvo) a jednoduchá sarkomera (hladké svalstvo). Mnohonásobné sarkomery jsou nejhojnější skupinou svalů, které spoluvytvářejí vnější stěnu těla hlístice. Jednoduché sarkomery tvoří 20 svalů hltanu, 1 sval střeva, 1 anální svěrač, 1 anální depresor, 8 svalů vulvy, 8 svalů dělohy a jeden stahovatelný pohlavní (gonadální) plášť. Samec má na místo svalů vulvy, dělohy a gonadálního pláště 41 specializovaných svalů určených k páření, z nichž některé jsou tvořeny z mnohonásobné a některé z jednoduché sarkomery [52].



Zvláštní svalovou buňkou je tzv. hlavová mesodermální buňka, která přiléhá k druhé zaoblené části hltanu. Její dva dlouhé výběžky putující podél dorsální a ventrální strany hltanu a začátku střeva *C. elegans* naznačují, že by její funkce mohla být užitečná při synchronizaci svalů hlavy a krku. Podobné svaly vyskytující se u jiných nematod však napomáhají trávení potravy. Funkce tohoto svalu u *C. elegans* však dosud nebyla zcela charakterizována [53].

#### **1.3.3.4. Trávicí systém *C. elegans***

Trávicí systém *C. elegans* se skládá z hltanu a střeva.

Hltan je epiteliální orgán, který má své vlastní svalové, nervové, strukturální a žlázné buňky. Jeho délka se pohybuje okolo 100  $\mu\text{m}$  a šířka okolo 20  $\mu\text{m}$ . Hltan je izolován od zbytku těla bazální membránou, která je v přímém styku s pseudocoelomem (nepravou tělní dutinou). V tomto prostoru dochází ke kontaktu (hormonální signalizaci) mezi hltanem a zbytkem těla hlístice. Tvar hltanu je typický. Prodloužená přední část je připojena k ústní dutině a nazývá se přední korpus, za ní následuje první zaoblená část hltanu tzv. mezikorpus a společně tvoří korpus. Za korpusem následuje zúžená část isthmus, na jehož vnějším povrchu je umístěn centrální nervový kruh, a za ním je hltan ukončen druhou zaoblenou částí hltanu, na kterou navazuje střevo [54].

Střevo je velkým orgánem, který plní řadu funkcí: trávení potravy, vstřebávání živin, syntesu a skladování makromolekul, zahájení vrozené imunitní odpovědi na patogeny a výživu zárodečných buněk. Skládá se z 20 velkých buněk, které jsou většinou umístěné symetricky v párech vedle sebe a tvoří dlouhou trubici, která vede téměř celým tělem hlístice. I když zpočátku střevo zabírá celý prostor těla, v dospělosti se zde vyskytují i pohlavní orgány. Střevo není pevně spojené s vnější trubicí, pevně je uchycené pouze hltanem a na konci těla konečníkem. Slabší vazby mezi bazální laminou střeva a vnější trubicí jsou tvořeny prostřednictvím podélných pruhů hemicentinu. Střevo není přímo inervováno a má pouze jeden asociovaný sval na jeho posteriální straně [55].

### 1.3.4. Genetika *C. elegans*

Prvním kompletně sekvenovaným genomem mnohobuněčného organismu byl genom *Caenorhabditis elegans*. Jeho sekvence byla zveřejněna v roce 1998 v časopise Science [56]. Délka sekvence genomu je 97 milionů párů bazí a odhaluje celkem 19 000 genů, z nichž více než 40% předpovězených proteinových produktů bylo nalezeno u jiných organismů [56].

Zhruba 15% genů *C. elegans* je organizováno v operonech, které tvoří 2 až 8 samostatných genů [57]. U tohoto organismu můžeme také pozorovat alternativní sestřih, který však není příliš uplatňován vzhledem k tomu, že geny mu podléhající mají často pouze jednu či dvě isoformy [58].

Genom hlístice je lokalizován na šesti párech chromozomů, z nichž pět párů tvoří autozomy a jeden pár je pohlavní chromozom. Pokud je šestý pár tvořen chromozomy XX, potom *C. elegans* bude hermafrodit, pokud jeden chromozom z páru XX chybí, označuje se jako XO a udává pohlaví samce. Křížením hermafrodita se samcem vznikne potomstvo, z nichž polovina budou hermafrodité a polovina samci [59].

## 1.4 Zelený fluorescenční protein

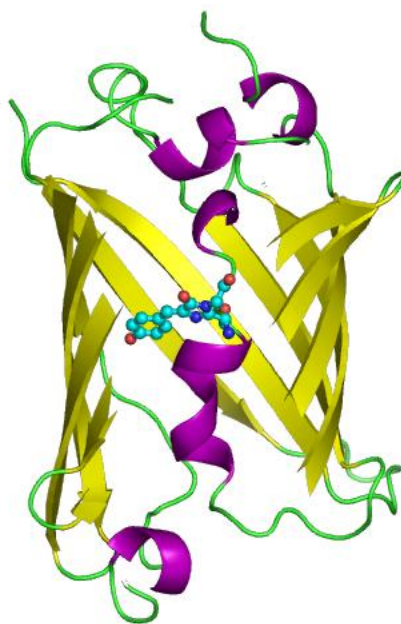
Zelený fluorescenční protein (GFP) byl poprvé izolován v roce 1962 Osamem Shimomurou z medúzy *Aequorea victoria*. Dnes se tento protein využívá ke specifické buněčné lokalizaci, a to především v oboru molekulární biologie. Jedná se o protein malé velikosti. Pokud je tento protein vystaven působení viditelného záření v modré oblasti, produkuje zelené fluorescenční světlo [60, 61].

### 1.4.1. Struktura a funkce zeleného fluorescenčního proteinu

Zelený fluorescenční protein se skládá z 238 aminokyselin, které společně vytváří protein sudovitého tvaru. Plášť soudku obsahuje především proteinové struktury  $\beta$ -skládaného listu, jeho okraje jsou tvořeny strukturou  $\alpha$ -helixu a v samotném centru

proteinu je vázána molekula chromoforu 4-(p-hydroxybenzylidin)imidazolidin-5-on, označovaná jako HBI, což je látka zodpovědná za barevnost molekuly tím, že je schopná absorbovat záření o určité vlnové délce. Za nepřítomnosti řádně složeného proteinového soudku je HBI neaktivní. Na vnitřním postranním řetězci barelu v tripeptidu Ser65-Tyr66-Gly67 dochází ke specifické cyklizační reakci, která vyvolává ionizaci HBI na fenolát a tvorbu chromoforu. Síť vodíkových vazeb v těchto postranních řetězcích určuje barvu, intenzitu a stabilitu GFP. První zveřejněnou krystalovou strukturou GFP byla struktura jeho mutanty S65T [62] a o měsíc později byla zveřejněna krystalová struktura divokého typu GFP [63, 64].

GFP vykazuje dva absorpční píky spadající do oblasti modrého viditelného záření, hlavní pík absorbuje při vlnové délce 395 nm a menší pík při 475 nm. K emisi záření zelené barvy dochází při vlnové délce 509 nm maximálního píku a u menšího píku k emisi při 540 nm [65].



*Obr.8: Struktura zeleného fluorescenčního proteinu s odstraněnou částí  $\beta$ -barelu, která odhaluje chromofor. Převzato z [66].*

Biochemický systém, izolovaný z *Aequora victoria*, zodpovědný za bioluminiscenci se skládá ze dvou úzce na sebe napojených proteinů – aequorinu a zeleného fluorescenčního proteinu. Aequorin předává část své energie GFP poté, co interaguje s

$\text{Ca}^{2+}$  ionty na základě ozáření modrým světlem. Takto sám získá energii, jejíž část dále předá GFP a ten následně emituje zelené záření pomocí již zmíněné molekuly chromoforu [67, 68].

#### **1.4.2. Použití zeleného fluorescenčního proteinu v molekulární biologii**

V buněčné biologii a jiných biologických oborech je zelený fluorescenční protein využíván k mapování genové exprese a lokalizaci proteinů v živých organismech. Biolog M. Chalfie poprvé použil právě modelový organismus *C. elegans* ke sledování exprese proteinů pomocí GFP [60]. V roce 2008 získali Osamu Shimomura, Martin Chalfie a Roger Y. Tsien Nobelovu cenu v oboru chemie za objev a vývoj tohoto zeleného fluorescenčního proteinu [69].

Gen proteinu je vpravován do genomu živých organismů pomocí injekce vektorů, buněčnou transformací, či křížením. Následně je GFP sledován v organismech pomocí fluorescenční mikroskopie [70]. Dnes jsou také mimo zeleného dostupné i jiné varianty fluorescenčních proteinů – žlutý YFP, modrý – BFP, CFP a nepříbuzný červený fluorescenční protein [63].

Nové možné použití proteinu zahrnuje například využití citlivého sledování intracelulárních procesů pomocí eGFP laserového systému [71].

## 2 Cíl práce

Diplomová práce se zabývá studiem exprese a funkce jaderného hormonálního receptoru *nhr-97 C. elegans*.

Dílčí cíle práce:

- Charakterizace genu *nhr-97 C. elegans*.
- Navrhnout, připravit a klonovat různé délky promotorů *nhr-97* (isoformy A a B) do vektoru pPD95.67.
- Připravit transgenní organismy *C. elegans* injikováním vektoru pPD95.67 s daným promotorem *nhr-97* do gonád mladých hermafroditů *C. elegans*.
- Zjistit, kdy exprese *nhr-97::GFP* začíná a v jakých tkáních *C. elegans* je gen exprimován. Porovnat expresi *nhr-97::GFP* u dvou různých isoform genů.
- Kvantitativně změřit expresi obou isoform *nhr-97* v jednotlivých stádiích vývoje *C. elegans* pomocí kvantitativní PCR.
- Studovat změny fenotypu *C. elegans* po inhibici *nhr-97* na posttranskripční úrovni metodou RNA interference.
- Najít vazebné místo v promotorové oblasti isoformy A a B *nhr-97* pro DNA vazebnou doménu *pha-4* bioinformatickými metodami. Studovat změny fenotypu *C. elegans* a změny exprese *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B* způsobené inhibicí *pha-4*/FoxA na posttranskripční úrovni metodou RNA interference.
- Studovat změny fenotypu transgenních *C. elegans* vyvolané zvýšenou expresí *nhr-97* (indukovanou expresí), pomocí injekce plasmidu, vytvořeného klonováním cDNA *nhr-97* do vektoru obsahujícího promotor HS (z *angl.* promoter of heat shock), do gonád organismu.
- Provést analýzu aminokyselinových sekvencí *nhr-97 C. elegans* a jeho paralogních receptorů bioinformatickými metodami.

## 3 Materiál a Metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1. Biologický materiál

##### Kmen *C. elegans*

**N2** – divoký typ *C. elegans* vyskytující se volně v přírodě (druh Bristol). Tento kmen byl poskytnut institutem CGC (*Caenorhabditis Genetics Center*, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA)

##### Kmeny *E. coli*

**OP 50** – potrava pro kultivaci *C. elegans*; očkováno na petriho misky s NGM

**TOP 10** – kompetentní buňky pro transformaci

#### 3.1.2. Biologická média

**Růstové médium pro nematoda (NGM):** 7 g BactoAgar; 0,8 g BactoPepton; 1 g NaCl; 333 ml cholesterolu v ethanolu (5 mg cholesterolu / 1 ml ethanolu); 333 ml 1M MgSO<sub>4</sub>; 8,33 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 333 ml H<sub>2</sub>O, autoklávováno

**LB agar:** 5 g BactoAgar; 3,33 g Trypton; 3,33 g NaCl; 1,67 g Yeast extract; 0,333 ml 1M NaOH; 333 ml H<sub>2</sub>O, autoklávováno

**LB medium:** 3,33 g Trypton; 3,33 g NaCl; 1,67 g Yeast extract; 0,333 ml 1 M NaOH; 333 ml H<sub>2</sub>O, autoklávováno

**10x PBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O do 1l, pH 7.4, autoklávováno

### 3.1.3. Klonovací vektory

**pRF4** – Vektor obsahující gen *rol-6* způsobující porušení struktury kolagenu pokožky u hlístice. Exprese genu způsobuje šroubovitě zkroucení těla hlístice, a tím i viditelnou změnu jeho pohybu. Této mutace se využívá k indikaci transgenního hermafrodita. Laboratoř molekulární biologie a genetiky dostala plasmid darem od Dr. M.W. Krause (NIH, USA).

**pPD95.67** – Vektor s nízkým počtem kopií a s jaderným lokalizačním signálem. Plasmid byl vytvořen synteticky přímo ke klonování fragmentů DNA určených k tvorbě transgenních organismů *C. elegans*. Vektor patří mezi tzv. plasmidy s nízkým počtem kopií, což jsou plasmidy vytvářející málo kopií v transformovaných buňkách. Jeho velikost je 4532 bp a obsahuje sekvenci kódující gen pro expresi GFP (green fluorescent protein), rezistenci k ampicilinu a restrikční místa potřebná pro vložení sekvence studovaného genu. Expresi GFP u potomků *C. elegans*, který byl vpraven mikroinjekcemi do gonád tohoto organismu, se lokalizuje v místech, ve kterých dochází k expresi studovaného genu. Laboratoř molekulární biologie a genetiky dostala tento plasmid darem od Dr. Andrew Fire (Stanford University School of Medicine, Stanford CA, USA).

**pPD49.78, pPD49.83** – Expresní vektory určené k indukci exprese studovaného genu. Vektory obsahují promotory tzv. HS (z *angl.* promoter of heat shock), které díky teplotní indukci přepisují studovaný gen ve velkém množství. Expresi genu u *C. elegans* lze sledovat v různých tkáních: ve střevě, svalech, neuronech, hltanu, atd. Vektory se navzájem zřetelně liší ve sledované expresi, která probíhá v jiných tkáních: pPD49.78 (Hsp 16-2) je exprimován velmi dobře v nervových a hypodermálních buňkách, pPD49.83 (Hsp 16-41) má expresi silnější ve střevě. Oba vektory mají zhruba stejnou velikost 3800 bp, obsahují gen pro rezistenci k ampicilinu a restrikční místa potřebná pro vložení sekvence studovaného genu. Vektory byly navrženy a poskytnuty Dr. Andrew Fire (Stanford University School of Medicine, Stanford CA, USA).

**pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup>** - Vektor o délce zhruba 4000 bp s kovalentně vázanou topoisomerasou I byl navržen pro rychlé klonování PCR produktů. Na 3' konci DNA obsahuje převis tvořený několika thymidiny (spojenými fosfodiesterovými vazbami) pro řízenou ligaci amplifikovaných PCR produktů (Taq polymerasa má terminální transferasovou aktivitu nezávislou na druhu templátu, která přidává jednotlivé deoxyadenosiny na 3' konce PCR

produktu). Dále obsahuje T7 a SP6 promotory pro transkripci *in vitro*, M13 přední a zpětná místa primerů pro sekvenování a geny pro rezistenci na ampicilin a kanamycin. Vektor navrhla a připravila firma *Invitrogen* (Kanada).

### 3.1.4. Enzymy

Taq DNA polymerasa	<i>Bioline</i> (Velká Británie)
RNA polymerasa (T7, Sp6)	<i>Fermentas</i> (Kanada)
T4 DNA ligasa	<i>Fermentas</i> (Kanada)
Proteinasa K: recombinant PCR grade (High Pure PCR Template Preparation KIT)	<i>Roche</i> (Německo)
alkalická fosfatasa: FastAP	<i>Fermentas</i> (Kanada)
Dnasa I (2 000 U/ml)	<i>Biolabs</i> (USA)

### Restrikční endonukleasy:

BamHI	<i>Fermentas</i> (Kanada)
EcoRI	<i>Fermentas</i> (Kanada)
EcoRV	<i>Fermentas</i> (Kanada)
NheI	<i>Biolabs</i> (USA)
PstI	<i>Fermentas</i> (Kanada)



### 3.1.5. Primery

Tab.2: Označení a sekvence použitých primerů. Primery byly objednány u firmy KRD (Česká Republika) a připraveny firmou Invitrogen (Kanada).

označení primeru	směr primeru	gen	sekvence ( 5' → 3' )
7038	kódující	<i>nhr-97</i>	atg tcc gga gat gcg caa cca agt
7291	kódující	<i>nhr-97</i>	aaa ctg cag cag acg tgc ttt gcc
7293	kódující	<i>nhr-97</i>	aaa ctg cag cct ata agt tct ctg agt ctc ttc
7294	antikódující	<i>nhr-97</i>	cgg gat cca tta ttc ttt tta atg att gaa aaa cg
7295	antikódující	<i>nhr-97</i>	cgg gat ccg gcg aag gcg gtg gcc gtg ctt cag
7296	kódující	<i>nhr-97</i>	aaa ctg cag ggt tga gaa tga ata cca cc
7420	antikódující	<i>nhr-97</i>	cgg gat cca ttc caa cga ata gac agc gat ga
7424	antikódující	<i>nhr-97</i>	tta aat gct gtc ggt tgt ata ttg
7491	kódující	<i>nhr-97</i>	cgt tac ggt gga aac tgc tc
7492	antikódující	<i>nhr-97</i>	aaa acg gca gta gcg aca ag
7499	kódující	<i>nhr-97</i>	aac caa gtt cca atc aac gtg
7500	antikódující	<i>nhr-97</i>	cgt agt aga ggt gcg aac agg
7616	kódující	<i>nhr-97</i>	aaa gct agc atg tcc gga gat gcg
7617	antikódující	<i>nhr-97</i>	gcg ata tct taa atg ctg tgc gtt
7580	kódující	<i>nhr-97</i>	aaa ctg cag tgg agt gga gct gta aat ggt tgg
11/27	kódující	<i>ama-1</i>	gag tca tag act gta gtg tgg aag atg
11/28	antikódující	<i>ama-1</i>	tga gaa gcc gtc cgc agt ag

### 3.1.6. Chemikálie

**absolutní ethanol** (*Penta*, Česká republika); **agarosa** (*Bioline*, Velká Británie); **ampicilin** (100 mg/ml), (*ICN Biomedicals Inc.*, USA); **10% azid sodný**; **2,5 mM dNTP**: vodný roztok obsahující 2,5 mM adenin, thymín, cytosin a guanin (*Bioline*, Velká Británie); **DTT** (100 mM); **70% ethanol** (*Penta*, Česká republika); **ethidium bromid 1% (w/v)** (*Serva*, Německo); **směs fenolu:chloroformu (1:1)** (*Thermo*, USA); **fluorescenční sondy # 149, # 86** (*Universal probe library*); **glykogen** (20 mg/ml), (*Fermentas*, Kanada); **hyperladder I**: standard pro elektroforetické stanovení velikosti fragmentu DNA, obsahuje zóny s velikostí 200, 400, 600 až 10 000 bp (*Bioline*, Velká Británie); **chlorid hořečnatý 50 mM** (*Bioline*, Velká Británie); **chloroform** (*Penta*, Česká republika); **inhibitor RNas** (40 U/ μl), (*Fermentas*, Kanada); **isopropanol** (*Penta*, Česká republika); **mix primerů** (20 μl sense primeru a 20 μl antikódujícího primeru oba o c= 25 μmol/l, 10 μl dH<sub>2</sub>O); **octan**

**sodný 10%** (*Sigma*, USA); **proteinasa K** (20 mg/ml); roztok náhodných DNA dlouhých 6 bp, tzv. randome hexamers (50 ng/  $\mu$ l); **redestilovaná voda pro injekce (dH<sub>2</sub>O)** (*B. Braun*, Německo); **RNasin** (40 U/  $\mu$ l), (*Promega*, USA); **rNTP mix** (25 mM ); **Savo** (*Bochemie*, Česká Republika); **Superscript II** (*Invitrogen*, Kanada); **DNA standard „1 kb PLUS“**: standard pro elektroforetické stanovení velikosti fragmentu DNA; obsahuje zóny s velikostí 100, 200, 300 až 10 000 bp (*BioLabs*, USA); **DNA standard „100 bp ladder“**: standard pro elektroforetické stanovení velikosti fragmentu DNA - obsahuje zóny s velikostí 100, 200, 300 až 1500 bp (vždy po 100 bp), (*BioLabs*, USA)

### *Pufry*

**DNA lyzační pufr (DNA lysis buffer)**: 0.1 M Tris pH 8.3, 50mM EDTA, 200 mM NaCl (*Roche*, Německo); **mix pro qPCR**: LightCycler® TaqMan® Master Version 5.0 (*Roche*, Německo); **promývací pufr (wash buffer)**: 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4% NP-40 (*Biolabs*, USA); **pufr pro transkripci in vitro**: 5x transcription reaction buffer (*Promega*, USA); **pufr pro DNA polymerasu short: 10 x optimalizační pufr (opti buffer)** (*Invitrogen*, Kanada); **pufr pro lýzu tkání (lysis buffer)** (High Pure PCR Template Preparation KIT, *Roche*, Německo) 50 mM Tris pH 8, 3 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4% NP-40; **pufr pro navázání DNA** (High Pure PCR Template Preparation KIT, *Roche*, Německo); **pufr pro vyloučení DNA** (High Pure PCR Template Preparation KIT, *Roche*, Německo); **pufr pro zatížení vzorků (loading buffer)**: bromfenolová modř 0,2%, glycerol 30% (*TaKaRa*, USA); tzv. **jednovláknový pufr** (5x first strand buffer, *Invitrogen*, Kanada); **ligační pufr: 10 x ligation buffer** (*Fermentas*, Kanada); **restrikční pufr: 10 x BamHI Buffer** ( s BSA) (*Fermentas*, Kanada); **resuspendační pufr**: 0.5% SDS, 5% 2-merkptoethanol, 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, dH<sub>2</sub>O (*Fermentas*, Kanada); 10x pufr pro alkalickou fosfatasu: FastDigest buffer (*Fermentas*, Kanada); **Pufr pro lýzu RNA**, tzv. RNA lysis buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 5% 2-merkptoethanol, 0.5% SDS (*Biolabs*, USA); **pufr „DNase buffer 10x“** (*Biolabs*, USA); **ředicí pufr**: 50 mM Tris pH 8, 0.4% NP-40, 2.5  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> (*Biolabs*, USA), 1  $\mu$ l DNase I; **TBE 0,5 x**: 0,5 M Tris báze (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), 0,01M ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), 0,5 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ( *Serva*, Německo; *Roth*, Karlsruhe, Německo; *Penta*, Česká republika); **vymývací pufr** (High Pure PCR Template Preparation KIT, *Roche*, Německo)

### *Komerční soupravy*

**souprava pro izolaci genomové DNA:** High Pure PCR Template Preparation KIT

*Roche* (Německo)

**souprava pro izolaci plasmidové DNA**

*Bio Basic Inc.* (USA)

### **3.1.7. Přístroje a vybavení**

Centrifugy - *Universal 32 R*

*Hettich* (Německo)

*Mini Centrifuge*

*National Labnet CO.* (USA)

horizontální vana a zdroj pro elektroforézu EC 500-90 EC *Apparatus Corporation* (USA)

Inkubátor ECHO therm

*Torrey* (USA)

Inkubátor Incucell

*BMT* (Česká Republika)

kamera Ultra- Lum U.V. Transiluminátor

*Biotech* (Česká republika)

Mikroskop Olympus BX60

*Olympus* (Japonsko)

Mikroskop Olympus BX60

*Olympus* ( Japonsko)

Mikroskop Olympus Narishige

*Olympus* (Japonsko)

Mikroskop Olympus SZX7

*Olympus* (Japonsko)

qPCR cyklér LightCycler

*Roche* (Švýcarsko)

spektrofotometr Nanodrop® ND 1000 UV/Vis Spectrophotometer

*Thermo Scientific* (USA)

termocyklér PTC-200 Engine thermal cycler

*MJ Research* (USA)

UV lampa Olympus U-RFL-T

*Olympus* (Japonsko)

třepačka OS-10

*Boeco* (Německo)

vodní lázeň Julabo TW 2

*Biotech* (Česká republika)

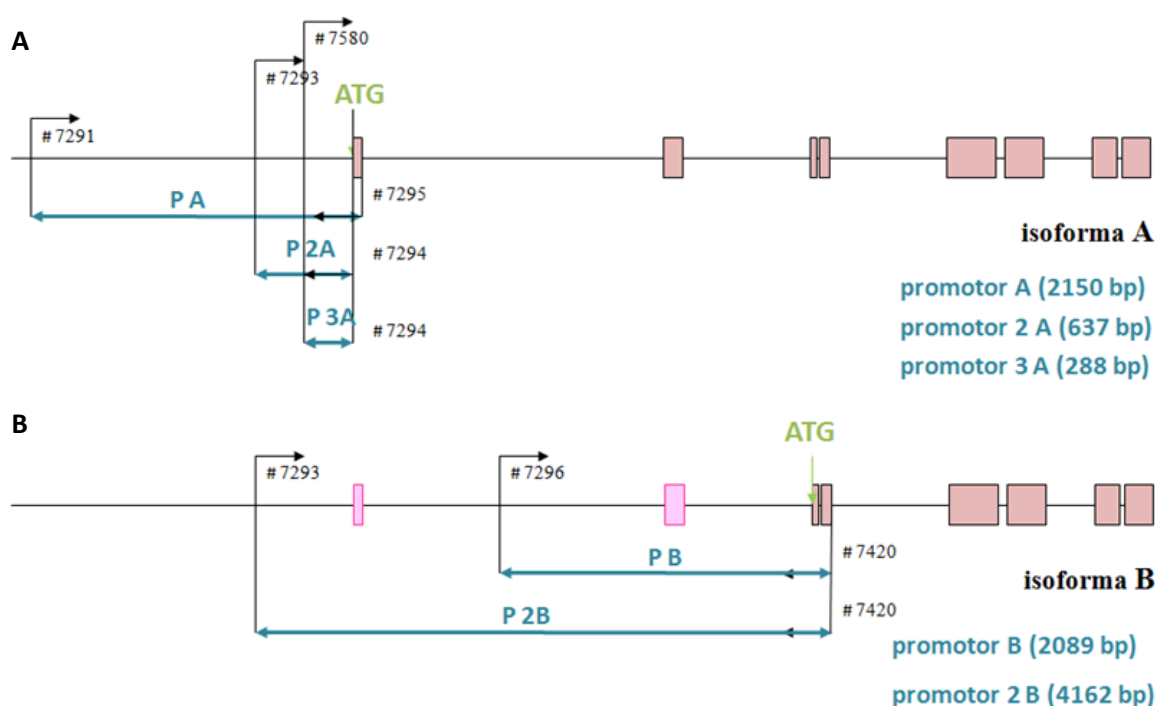
vortex Vortex 2 Genie

*Scientific industrie* (USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1. Studium exprese *nhr-97* v modelovém organismu *C. elegans* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP)

Pro studium exprese *nhr-97* v modelovém organismu *C. elegans* byly navrženy sekvence promotorů. Pro isoformu *H27C11.1a* (dále označovanou jako A) byly navrženy sekvence PA (2150 bp), P2A (637 bp) a P3A (288 bp). Pro isoformu *H27C11.1b.1* (dále označovanou jako B) byly navrženy sekvence PB (2089 bp) a P2B (4162 bp), (Obr.9), [72]. Sekvence PA a PB byly navrženy a připraveny zaklonováním jejich PCR produktů do plasmidu pPD95.67 již v bakalářské práci [45]. Jednotlivé sekvence se liší isoformou genu, pro kterou byly navrženy, délkou a obsahem 1. nebo 2. exonu genu *nhr-97*.



Obr.9: Navržené sekvence promotorů pro isoformu A (A) a isoformu B (B) genu *nhr-97*. Konstrukty PA (2150 bp) a PB (2089 bp) byly navrženy a připraveny již v bakalářské práci [45]. Sekvence promotorů P2A (637 bp) a P3A (288 bp) isoformy A byly navrženy s kratšími délkami. Sekvence promotoru P2B isoformy B byla navržena o délce 4162 bp. Pro lepší představu navržených sekvencí promotorů PB a P2B jsou světlým orámováním ve schématu isoformy B (B) zobrazeny první dva exony isoformy A. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

### 3.2.1.1. Isolace genomické DNA *C. elegans*

Nematoda (směs vývojových stádií) pěstovaná na půdě určené pro růst nematod (NGM) na Petriho miskách byla smyta destilovanou vodou z misek a několikrát byla promyta v destilované vodě z důvodu odstranění bakterií ze vzorku. Po odebrání 100 µl čistého vzorku bylo přidáno 200 µl pufru pro lýzu tkání (High Pure PCR Template Preparation KIT, Roche) a 55 µl proteinázy K, která štěpí přírodní keratin. Promíchaný vzorek byl inkubován při 55°C po dobu 1 hod. Po přidání 200 µl pufru pro navázání DNA (High Pure PCR Template Preparation KIT, Roche) byl vzorek jemně promíchán a inkubován při 70°C po dobu 10 min. Následně bylo ke vzorku přidáno 100 µl isopropanolu a vše bylo krátce promícháno. Směs byla přenesena na kolonku, dodávanou přímo výrobcem (Roche, Německo), poté byla centrifugována 1 min při 8000 x g. Do kolonky bylo přidáno 500 µl pufru pro vyloučení DNA a vzorek byl opět centrifugován 1 min při 8000 x g. Filtr kolonky byl dvakrát promyt 500 µl promývacího pufru a pokaždé centrifugován 1 min při 8000 x g. Nakonec byla kolonka centrifugována při 12 000 x g po dobu 30 sec, pro zbavení se veškerých solí a promývacích roztoků.

Kolonka byla vložena do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky a do středu filtru bylo pipetováno 200 µl vymývacího pufru předehřátého na 70°C. Zkumavka s kolonkou byla centrifugována 1 min při 8000 x g, čímž jsme získali čistý vzorek genomické DNA o objemu 200 µl.

Izolace gDNA *C. elegans* byla provedena pomocí komerční soupravy High Pure PCR Template Preparation KIT firmy Roche (Německo). Postup byl proveden podle pokynů výrobce.

### 3.2.1.2. Příprava navržených konstruktů promotorů *nhr-97* z gDNA *C. elegans*

Příprava jednotlivých konstruktů byla provedena obdobně jako v bakalářské práci (42).

Izolovaná gDNA z kmene N2 *C. elegans* byla použita pro přípravu sekvencí promotorů pomocí metody PCR se specificky navrženými primery:

Konstrukty pro expresi *nhr-97::GFP* (Obr.9 A a B)

***nhr-97::GFP P2A*** - primer 7293 (sense) a 7294 (antisense), 637 bp

***nhr-97::GFP P3A*** - primer 7580 (sense) a 7294 (antisense), 288 bp

***nhr-97::GFP P2B*** - primer 7293 (sense) a 7420 (antisense), 4161 bp

Všechny konstrukty byly klonovány do plasmidu pPD95.67 (Kap 3.1.3. Klonovací vektory).

Metoda PCR byla provedena podle standardního protokolu (Kap. 3.2.5.2 Metoda PCR). Pro kontrolu průběhu PCR byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu za standardních podmínek (Kap. 3.2.5.4. Elektroforetické stanovení DNA na agarosovém gelu). Následně byly vzorky purifikovány metodou fenol-chloroformové extrakce a ethanolové precipitace (Kap.3.2.5.3. Fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace DNA).

Pro „očistění“ restrikčních míst produktů PCR bylo provedeno restrikční štěpení (Kap. 3.2.5.5. Restrikční štěpení DNA). Použili jsme restrikční endonukleasy BamHI (kódující) a PstI (antikódující), jejichž sekvence byly navrženy do všech specificky navržených primerů (# 7293, # 7580, # 7293 s BamHI a # 7294, # 7420 s PstI). Restrikčně rozštěpen – linearizován - (pomocí BamHI, PstI) byl také plasmid pPD95.67 (Kap. 3.2.5.5. Restrikční štěpení DNA). Proto, aby nedocházelo k opětovnému uzavírání linearizovaného vektoru, byla provedena jeho defosforylace pomocí alkalické fosfatasy (Kap. 3.2.5.6. Odstranění fosfátových skupin klonovacích vektorů). Všechny vzorky byly přečištěny fenol-chloroformovou extrakcí a ethanolovou precipitací a byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu pro kontrolu přítomnosti a zjištění přibližné koncentrace DNA. Na základě výsledků posledního elektroforetického stanovení bylo provedeno klonování jednotlivých konstruktů (P5A, P4A, P2B) do plasmidu pPD95.67 (Kap. 3.2.5.7. Klonování insertů do vektorů). Poté byla provedena transformace dle standardního protokolu (Kap. 3.2.5.8. Transformace kompetentních buněk teplotním šokem) a izolace plasmidové DNA (Kap. 3.2.5.9. Izolace plasmidové DNA). Po izolaci plasmidové DNA bylo provedeno kontrolní restrikční štěpení s elektroforézou na agarosovém gelu pro ověření zaklonování příslušných insertů do plasmidu. Restrikční štěpení bylo provedeno dle standardního protokolu s enzymy BamHI a PstI. Pro ověření správnosti klonovaných konstruktů do plasmidu bylo provedeno stanovení sekvence DNA (Kap. 3.2.5.11. Stanovení sekvence DNA ).

### **3.2.1.3. Příprava transgenních linií *C. elegans* a studium exprese *nhr-97***

Pro každý fúzní konstrukt *nhr-97::GFP* PA, *nhr-97::GFP* P2A, *nhr-97::GFP* P3A, *nhr-97::GFP* PB a *nhr-97::GFP* P2B byly připraveny nejméně 2 transgenní linie *C. elegans*. Linie byly získány metodou mikroinjikování fúzních konstruktů do gonád mladého hermafrodita. (Kap. 3.2.5.12. Příprava transgenních linií *C. elegans* mikroinjikováním).

Detekcí exprese GFP ve tkáních a buňkách hádátka byla určena exprese *nhr-97* (Kap.3.2.5.13. Mikroskopie transgenních linií *C. elegans*).

## **3.2.2. Kvantitaivní PCR *nhr-97***

### **3.2.2.1. Izolace RNA *C. elegans***

Pro metodu kvantitativní PCR jsme izolovali RNA ze všech vývojových stádiích hádátka jednotlivě. Proto jsme pro izolaci RNA nejprve připravili jednotlivá vývojová stadia *C. elegans* (Kap. 3.2.5.1. Kultivace *C. elegans*).

Jednotlivá stadia pěstovaná na NGM na Petriho miskách, jsme smyli pomocí vody a zamrazili při teplotě -80°C. Zmražené pelety (20 µl) byly resuspendovány v 500 µl resuspendačního pufru s 20 µl proteinasy K (20 mg/ml). Po 60 sekundách míchání na přístroji vortex byl vzorek inkubován při 55°C po dobu 60 minut. Následně byla provedena fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace (Kap. 3.2.5.3. Fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace DNA). U vzorku, jehož vrchní vrstva byla příliš viskózní jsme přidali znovu vodu a fenol. Na konci ethanolové precipitace byl vzorek rozpuštěn v 12 µl dH<sub>2</sub>O. 2 µl vzorku byly použity pro kontrolu průběhu izolace RNA agarosovou elektroforézou (Kap. 3.2.5.4. Elektroforetické stanovení DNA na agarosovém gelu).

### 3.2.2.2. Ošetření RNA DNasou

K ošetření vzorku DNasou byl připraven reakční mix:

Reakční směs	V (μl)
RNA	10
Pufr „10x DNase buffer“	5
DNasa I	5
dH <sub>2</sub> O	29,5
Celkový objem reakční směsi	50

Reakční směs byla inkubována při teplotě 37°C po dobu 30 minut. Následně byla provedena fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace (Kap. 3.2.5.3. Fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace DNA). Vzorek byl rozpuštěn ve 12 μl dH<sub>2</sub>O. 2 μl vzorku byly použity pro kontrolu průběhu reakce agarosovou elektroforézou. Koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Kap. 3.2.5.10. Stanovení koncentrace nukleových kyselin). Takto byly zpracovány vždy tři nezávislé vzorky celkové RNA pro jednotlivá vývojová stádia *C. elegans*.

### 3.2.2.3. Reversní transkripce RNA

Komplementární DNA byla připravena reversní transkripcí izolované RNA. Přibližně 1 μg RNA jednotlivých stádií *C. elegans* byl smíchán s 2 μl roztoku náhodných DNA dlouhých 6 bp, tzv. randome hexamers (50 ng/ μl) a dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 12 μl. Následně byl vzorek zahřát na 65°C po dobu 5 min a 5°C na 5 min a poté byl zchlazen na suchém ledu. Po přidání 4 μl pufru (5x jednovlákonový pufr), 1 μl 100 mM dithiotreitolu (DTT), 1 μl mix deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP mix), 1 μl RNasin a 1 μl Superscript II byla směs inkubována nejprve při teplotě 25°C po dobu 10 min, poté při 42°C na 60 min a nakonec při 70°C na 5 min a poté byla zchlazena. Jednovláknová cDNA slouží jako template pro následnou qPCR se specifickými primery.



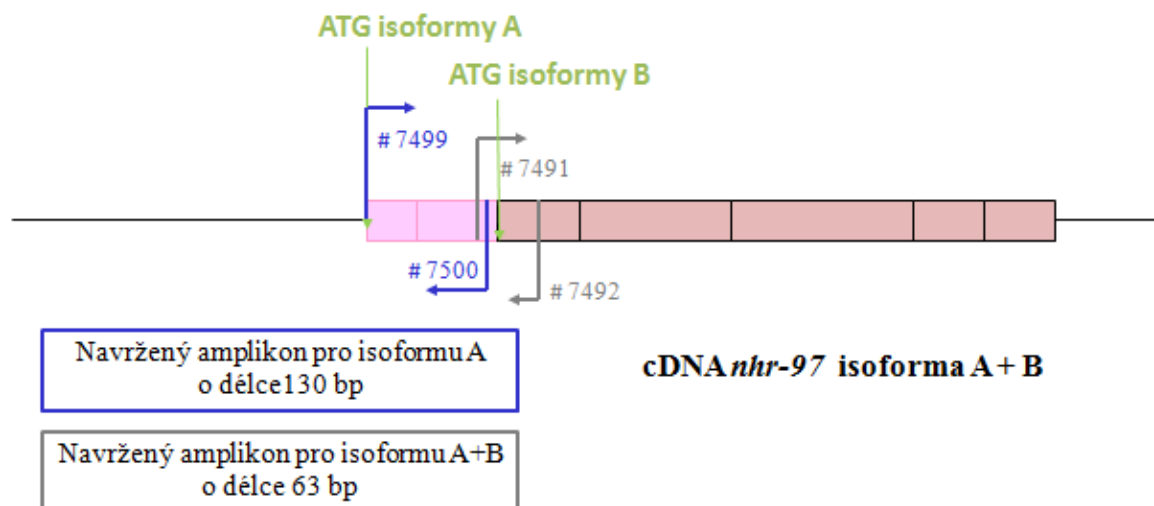
### 3.2.2.4. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

K amplifikaci templátu metodou kvantitativní PCR (qPCR) byla použita připravená cDNA (viz. výše) z jednotlivých vývojových stádií *C. elegans*. Připravená reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala 4 µl cDNA, 4 µl mixu pro qPCR (Roche, Německo), 2 µl fluorescenční sondy, 2 µl mixu primerů a 8 µl dH<sub>2</sub>O. Kvantitativní PCR byla provedena pomocí přístroje qPCR cyklér LightCycler (Roche, Německo).

Kvantitativní množství cDNA bylo měřeno pro isoformu A *nhr-97* a pro obě isoformy společně A+B *nhr-97* (Tab.3, Obr. 10).

Tab.3: Fluorescenční značky a primery použité pro isoformy A a B *nhr-97* během stanovení množství cDNA metodou qPCR. Sekvence primerů a fluorescenčních značek byly pro *nhr-97* generovány pomocí databáze „Universal Probe Library for *C. elegans*“ (Roche Applied Science). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

isoforma <i>nhr-97</i>	fluorescenční sonda	kódující primer	antikódující primer
A	# 149	7491	7492
A+B	# 86	7499	7500



Obr.10: Schéma cDNA *nhr-97* isoform A+B. Exony společné pro obě isoformy jsou orámované černě, první dva exony isoformy A jsou označeny světlým orámováním. Primery 7499 a 7500 označují sekvenci použitou pro měření mRNA isoformy A *nhr-97* během qPCR s použitou fluorescenční značkou # 149. Primery 7491 a 7492 označují

sekvenci použitou pro měření mRNA isoformem A+B *nhr-97* během qPCR s použitou fluorescenční značkou # 86. Sekvence primerů a fluorescenčních značek byly pro *nhr-97* generovány pomocí databáze „Universal Probe Library for *C. elegans*“ (Roche Applied Science). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

Kapiláry obsahující jednotlivé reakční směsi se specifickými primery pro dané reakce byly vloženy do qPCR cykléru. Reakce probíhaly dle reakčního schématu:

1. 95°C 10 min
2. 95°C 15 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 sec
5. opakování 2. - 4. kroku 45x

Množství DNA bylo změřeno spektrofotometricky (při  $\lambda$  540 a 630 nm) během každého reakčního cyklu. Každý vzorek byl proměřen nejméně dvakrát. Výsledky získané pro *nhr-97* byly normalizovány oproti velké podjednotce RNA polymerasy II, která je kódována genem *ama-1*, jehož exprese je během vývoje *C. elegans* konstantní [73].

Pro vyjádření množství exprimovaného genu v daném vývojovém stádiu *C. elegans* jsme vypočetli hodnoty  $f_{\text{norm.}}$ ,  $C_{\text{p norm.}}$  a  $\Delta C_{\text{p}}$ . (I, II, III). Prahová hodnota cyklu ( $C_{\text{p}}$ ) představuje počet amplifikačních cyklů potřebných k dosažení počítacem předem určené hraniční koncentrace stanovovaného úseku DNA ve vzorku.  $C_{\text{p}}$  studovaného genu je nepřímo úměrné množství templátu přítomného na začátku reakce a množství tohoto templátu přímo odpovídá množství mRNA v původním vzorku použitým pro přípravu cDNA. Vzhledem k rozdílnému stupni degradace mRNA v jednotlivých vzorcích a různé efektivitě reverzní transkripce, bylo pro porovnání exprese studovaného genu mezi jednotlivými vzorky nutné provést normalizaci zjištěných hodnot  $C_{\text{p}}$  pomocí normalizačního faktoru ( $f_{\text{norm.}}$ ) (II). Hodnoty  $f_{\text{norm.}}$  byly vypočteny z hodnot  $C_{\text{p}}$  stanovených z jednotlivých vzorků pro referenční gen *ama-1*. Exprese *nhr-97* během vývoje *C. elegans* byla vztažena k expresi *nhr-97* u embryí (III).

- *normalizační faktor* ( $f_{norm.}$ )

$$f_{norm} = \frac{Cp_{ama-1}(E)}{Cp_{ama-1}(VZ)} \quad (I)$$

- *hodnoty Cp normalizované k referenčnímu genu* ( $Cp_{norm.}$ )

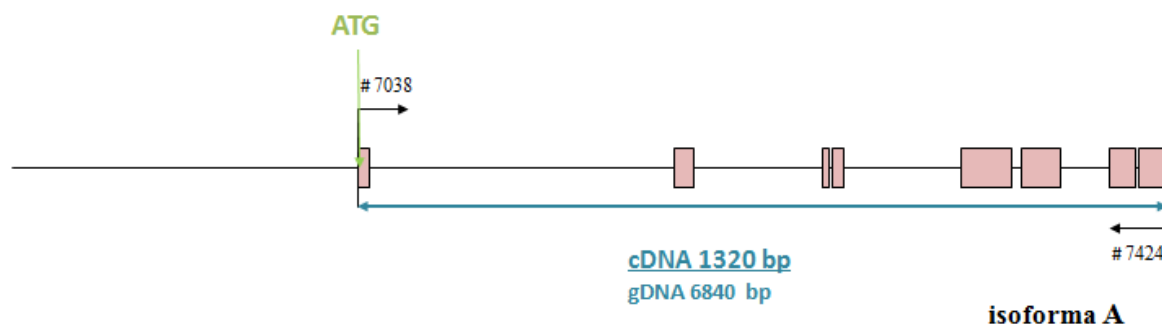
$$Cp_{norm} = Cp_{nhr-97} \cdot f_{norm} \quad (II)$$

- *exprese nhr-97 během vývoje C. elegans (VZ) vztažená k expresi nhr-97 v embryích (E) C. elegans ( $\Delta Cp$ )*

$$\Delta Cp = Cp_{norm.}(E) - Cp_{norm.}(VZ) \quad (III)$$

### 3.2.3. Inhibice *nhr-97* metodou RNA interference

Pro přípravu dsRNA byla navržena sekvence cDNA *nhr-97* isoformy A o délce 1320 bp (Obr.11).



Obr. 11: Navržená sekvence cDNA (pouze exony označené růžově) pro přípravu dsRNA pro metodu RNAi. Pro navržení sekvence o délce 1320 bp byla použita isoforma A *nhr-97*. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

#### 3.2.3.1. Příprava konstruktů cDNA pro RNAi *nhr-97*

cDNA byla získána izolací RNA z kmene N2 *C. elegans* (směs stádií) s následnou reversní transkripcí (Kap. 3.2.2.1. Izolace RNA *C. elegans*, 3.2.2.2. Ošetření RNA DNase, 3.2.2.3. Reversní transkripce RNA). Takto získaná cDNA byla použita pro přípravu konstruktů

obsahujícího téměř celou část cDNA *nhr-97* pomocí metody PCR se specificky navrženými primery: primer 7038 (sense) a 7424 (antisense). PCR produkt *nhr-97* o délce 1320 bp (Obr.11) byl klonován do plasmidu pCRII TOPO (Kap 3.1.3. Klonovací vektory).

Metoda PCR byla provedena podle standardního protokolu (Kap. 3.2.5.2 Metoda PCR). Pro kontrolu průběhu PCR byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu za standardních podmínek (Kap. 3.2.5.4. Elektroforetické stanovení DNA na agarosovém gelu). Následně byl vzorek purifikován metodou fenol-chloroformové extrakce a ethanolové precipitace (Kap. 3.2.5.3. Fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace DNA) a byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu pro kontrolu přítomnosti a zjištění přibližné koncentrace PCR produktu. Na základě výsledků posledního elektroforetického stanovení byl sestaven protokol jednotlivých objemů reakční směsi pro ligaci konstruktu cDNA do plasmidu pCRII TOPO:

Reakční směs	V(μl)
produkt PCR (cDNA <i>nhr-97</i> pro RNAi)	1
ligační pufr: 10x	1
klonovací vektor pCRII TOPO	2
ligasa T4 DNA	1
dH <sub>2</sub> O	5
celkový objem reakční směsi	10

Reakce probíhala přes noc při teplotě 16°C.

Poté byla provedena transformace dle standardního protokolu (Kap. 3.2.5.8. Transformace kompetentních buněk teplotním šokem). Následně byla provedena izolace plasmidové DNA (Kap. 3.2.5.9. Isolace plasmidové DNA). Po její izolaci bylo provedeno kontrolní restriční štěpení s elektroforézou na agarosovém gelu pro ověření správného průběhu klonování insertu do plasmidu pCRII TOPO. Restriční štěpení bylo provedeno dle standardního protokolu s enzymy BamHI a NotI. Pro ověření správného průběhu klonování konstruktů do plasmidu bylo provedeno také stanovení sekvence DNA (Kap.3.2.5.11. Stanovení sekvence DNA).

### 3.2.3.2. Příprava dsRNA

#### 3.2.3.2.1. Linearizace plasmidové DNA

Linearizace plasmidu pCRII TOPO byla provedena s restričními endonukleasami BamHI a NotI.

Reakční směs	1.reakce (BamHI), V(μl)	2.reakce (NotI), V(μl)
Plasmid pCRII TOPO	15	15
restriční pufr Bam HI: 10x (s BSA)	3	3
BamHI	2	-
NotI	-	2
dH <sub>2</sub> O	10	10
celkový objem reakční směsi	30	30

Reakce probíhala přes noc při teplotě 37°C.

Po přečištění vzorku fenol-chloroformovou extrakcí a ethanolovou precipitací byla DNA rozpuštěna ve 20 μl dH<sub>2</sub>O a byla provedena elektroforéza s 1 μl vzorku na agarosovém gelu pro kontrolu přítomnosti a zjištění přibližné koncentrace DNA.

#### 3.2.3.2.2. Transkripce DNA *in vitro*

Pro transkripci DNA *in vitro* byl použit takový objem linearizovaného plasmidu pCRIITOP, aby celkové množství templátu v reakční směsi bylo 1 ng, proto byla změřena koncentrace vzorků spektrofotometricky pomocí Nanodropu (Kap. 3.2.5.10. Stanovení koncentrace nukleových kyselin):

Vz. č. 1 (1. reakce, BamHI): 130 ng/μl

Vz. č. 2 (2. Reakce, NotI): 181 ng/ μl

Reakční směs	Vz.č.1, V(μl)	Vz.č.2, V(μl)
DNA	8	6
Pufr pro transkripci <i>in vitro</i> : 5x	10	10
rNTP mix (25 mM)	10	10
DTT (100 mM)	5	5
RNA polymerasa (T7, Sp6)	1,5	1,5
RNasin (40 U/ μl)	1,25	1,25
dH <sub>2</sub> O	14,25	16,25
celkový objem reakční směsi	50	50

Vzorek byl inkubován při 37°C po dobu 2 hodin. Následně byla provedena elektroforéza 1 μl vzorku na agarosovém gelu pro kontrolu přítomnosti a zjištění přibližné koncentrace RNA.

#### 3.2.3.2.3. Příprava dvouvláknové RNA

Smícháním 50 μl vz.č. 1 a 50 μl vz. č. 2, jejich následnou inkubací při teplotě 70°C po dobu 10 min a schlazením na pokojovou teplotu po dobu 30 min jsme získali dvouvláknovou RNA. Vzorek byl následně přečištěn fenol-chloroformovou a ethanolovou precipitací a rozpuštěn ve 20 μl dH<sub>2</sub>O.

#### 3.2.3.3. Mikroinjekce dsRNA a studium vlivu RNAi na organismus *C. elegans*

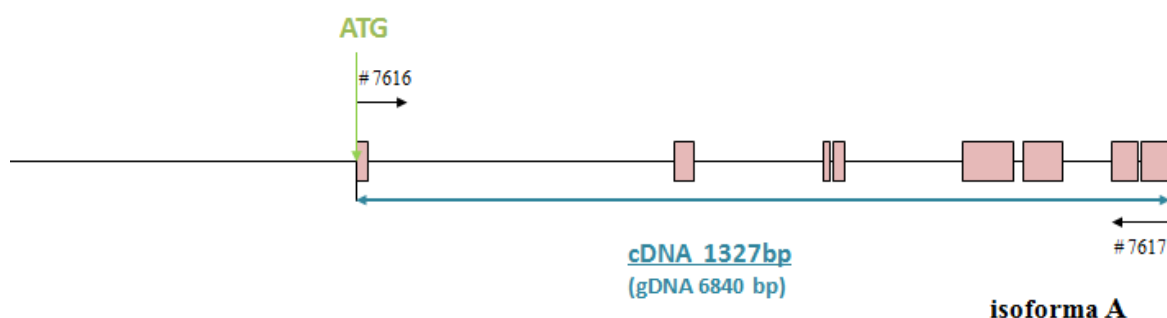
Připravená dsRNA (c = 1 μg/μl) byla mikroinjikována do syncytia vaječníků mladého dospělého hermafrodita *C. elegans*. Mikroinjekce byly provedeny pomocí mikroskopu Olympus Inverted System Microscope IX70 vybaveným Narishige Mikromanipulátorem (*Olympus*, Tokyo, Japan). Mikroinjekce provedla Hana Prouzová z Laboratoře molekulární biologie a genetiky na ÚBBP.

Matky *C. elegans* byly umístěny na Petriho misky s NGM a OP 50 a uchovávány při teplotě 22°C. Po 12 hodinových intervalech byly přenášeny na nové misky a vždy po 12 hodinách od přenesení matky na nové misky, bylo počítáno celkové množství potomků (mikroskop Olympus SD 30), počet nevyvinutých embryí a nevyvinutých larev v daném

stádiu. Zároveň byly sledovány změny ve fenotypu a životním cyklu potomků. Dokumentace experimentu byla provedena pomocí mikroskopu BX60 vybaveným kamerou Olympus DP30BW.

### 3.2.4. Indukovaná exprese *nhr-97* v organismu *Caenorhabditis elegans*

Pro indukovanou expresi *nhr-97* *C. elegans* byla navržena sekvence cDNA *nhr-97* isoformy A o délce 1327 bp. (Obr.12)



Obr.12: Navržená sekvence cDNA pro indukovanou expresi *nhr-97* *C. elegans*. Pro navržení sekvence o délce 1327 bp byla použita isoforma A *nhr-97*. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

#### 3.2.4.1. Příprava konstruktů cDNA pro indukovanou expresi *nhr-97*

cDNA byla získána izolací RNA z kmene N2 *C. elegans* s následnou reversní transkripcí (Kap.3.2.2.3 Reversní transkripce RNA). Takto získaná cDNA byla použita pro přípravu konstruktů pomocí metody PCR se specificky navrženými primery: primer 7616 (sense) a 7617 (antisense). Konstrukt *nhr-97* o délce 1327 bp (Obr.12) byl klonován do dvou plasmidů pPD49.78 a pPD49.83, protože se vzájemně liší intenzitou exprese v různých tkáních *C. elegans* (Kap. 3.1.3. Klonovací vektory).

Metoda PCR byla provedena dle standardního protokolu (Kap.3.2.5.2. Metoda PCR). Pro kontrolu průběhu PCR byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu za standardních podmínek (Kap.3.2.5.4. Elektroforetické stanovení DNA na agarosovém gelu). Následně byly vzorky purifikovány metodou fenol-chloroformové extrakce a ethanolové precipitace. Pro „očišťení“ restrikčních míst produktu PCR bylo provedeno restrikční štěpení. Byly

použity restriční endonukleasy EcoRV (kódující) a NheI (antikódující), jejichž sekvence byly zakonponovány do specificky navržených primerů (# 7616 EcoRV; # 7617 NheI). Restričně rozštěpeny – linearizovány - (EcoRV, NheI) byly také plasmidy pPD49.78 a pPD49.83 (Kap. 3.2.5.5. Restriční štěpení DNA), které byly následně použity pro klonování konstruktů cDNA. Proto, aby nedocházelo k opětovnému uzavírání linearizovaných vektorů, byla provedena jejich defosforylace pomocí alkalické fosfatasy (Kap. 3.2.5.6. Odstranění fosfátových skupin klonovacích vektorů). Vzorky byly přečištěny fenol-chloroformovou extrakcí a ethanolovou precipitací a byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu pro kontrolu přítomnosti a zjištění přibližné koncentrace DNA. Na základě výsledků posledního elektroforetického stanovení bylo provedeno klonování konstruktů cDNA do plasmidů pPD49.78 a pPD49.83:

Reakční směs	V(μl)
produkt PCR (cDNA <i>nhr-97</i> )	6
ligační pufr: 10x	2
klonovací vektor pPD49.78, pPD49.83	2
ligasa T4 DNA	2
dH <sub>2</sub> O	8
celkový objem reakční směsi	20

Reakce probíhala přes noc při teplotě 16°C.

Poté byla provedena transformace dle standardního protokolu (Kap. 3.2.5.8. Transformace kompetentních buněk teplotním šokem). Následně byla provedena izolace plasmidové DNA (Kap. 3.2.5.9. Izolace plasmidové DNA). Po izolaci plasmidové DNA bylo provedeno kontrolní restriční štěpení s elektroforézou na agarosovém gelu pro ověření přítomnosti insertu v plasmidu. Restriční štěpení bylo provedeno dle standardního protokolu s enzymy EcoRV a NheI.

Plasmidová DNA se zaklonovaným konstruktem cDNA *nhr-97* isoformy A o koncentraci 1 μg/μl byla injikována společně s plasmidem pRF4 o koncentraci 1 μg/μl do syncytia vaječníků mladého dospělého N2 hermafrodita (Kap. 3.2.5.12. Příprava transgenních linií *C. elegans* mikroinjikováním). Následně byli vybráni transgenní potomci a byli kultivováni až do získání F2 generace. Misky s transgenními potomky byly vloženy na 30 minut při



teplotě 37°C do termostatu, aby došlo k indukci exprese studovaného genu (Kap.3.1.3. Klonovací vektory).

### **3.2.5. Molekulárně biologické metody**

#### **3.2.5.1. Kultivace *C. elegans***

##### Kultivace

Kmen *C. elegans* byl kultivován v laboratoři na půdách pro růst nematod (NGM), které byly asepticky nalévány do Petriho misek. NGM byly očkovány bakteriální kulturou *Escherichia coli* OP 50, kterou se *C. elegans* živí. Hlístice byly sledovány pod mikroskopem Olympus SD30 (Olympus, Tokyo, Japan). Linie je udržována periodickým přenášením hlístic na novou misku pomocí platinového drátku na skleněné tyčince, nebo byla zmrazena na -70°C.

##### Synchronizace kultury *C. elegans*

Petriho misky s gravidními hermafrodity byly smyty pomocí dH<sub>2</sub>O do centrifugačních zkumavek o objemu 12 ml a několikrát byly dH<sub>2</sub>O promyty. Dva ml 5 M NaOH a 1 ml Sava (*Bochemie*, Bohumín, Česká Republika) byly přidány k 7 ml dH<sub>2</sub>O s červy *C. elegans*. Vzorek byl třepán po dobu 6 min v ruce, dokud červi nezmizeli a zůstala pouze jejich embrya. Poté byl roztok rozdělen do dvou zkumavek a rychle byla přidána dH<sub>2</sub>O, aby nedošlo k rozpadu i embryí. Následovala centrifugace vzorku 1000 x g po dobu 5 min. Supernatant byl odsát a opět byla přidána voda, následovala centrifugace za stejných podmínek. Promytí vzorku vodou proběhlo 6x. Peleta s embryí byla rozpuštěna v 10 ml 1x PBS a inkubována a míchána na třepačce přes noc při pokojové teplotě. Následující den byla kultura červů *C. elegans* synchronizována na stádium L1.

#### **3.2.5.2. Metoda PCR**

Metoda PCR byla provedena podle standardního protokolu se specifickými primery a templáty (N2 gDNA, N2 cDNA) s použitím Taq DNA polymerasy. Metoda PCR byla využita pro amplifikaci předem zvolených úseků DNA.

K amplifikaci byla použita gDNA (cDNA) izolovaná z *C. elegans* přírodního typu a připravená k použití. Sekvence promotorů byly označeny na obou koncích primery, které byly pro metodu PCR předem navrženy (viz. kapitola 3.1.5. Primery).

<b>Reakční směs pro PCR</b>	<b>V (μl)</b>
templátová DNA	1 μl
10x optimalizační pufr	5 μl
primer 1	2 μl
primer 2	2 μl
DNA polymerasa Short	1 μl
2,5 mM dNTP	2 μl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	5 μl
dH <sub>2</sub> O	32 μl
celkový objem reakční směsi	50 μl

- *Reakční podmínky PCR:*

- |                     |      |          |
|---------------------|------|----------|
| 1. denaturace       | 95°C | 60 sec   |
| 2. denaturace       | 95°C | 30 sec   |
| 3. nasedání primerů | 60°C | 40 sec   |
| 4. elongace         | 68°C | 60 sec   |
| 5. zpět na krok 2.  |      | 30 cyklů |
| 6. elongace         | 68°C | 300 sec  |
| 7. chlazení         | 10°C | 120 sec  |

### **3.2.5.3. Fenol-chloroformová extrakce a ethanolová precipitace DNA**

Vzorek DNA v Eppendorfově zkumavce byl doplněn vodou (dH<sub>2</sub>O) na objem 100 μl a k němu byla přidána směs fenol:chloroformu (1:1) o objemu 60 μl. Následně byl roztok promíchán a centrifugován při 10 000 g po dobu 10 min. Horní vodná fáze obsahující DNA byla přenesena do nové zkumavky. K vodné fázi bylo přidáno 60 μl chloroformu, roztok byl protřepán a poté byl centrifugován za stejných podmínek.

Horní vodná fáze byla opět přenesena do nové zkumavky a bylo k ní přidáno 10 µl 10% octanu sodného, 1 µl glykogenu a 350 µl vychlazeného absolutního ethanolu. Směs byla promíchána na přístroji vortex a uložena na 30 min do drtě suchého ledu. Poté byl vzorek centrifugován při 15 000 g po dobu 30 min při teplotě 4°C. Na dně zkumavky se vytvořila peleta DNA. Supernatant byl opatrně vylit, aby nedošlo k utržení pelety a zkumavka byla promyta 150 µl absolutního ethanolu. Peleta 10 min schla na vzduchu a po odpaření zbylého ethanolu byla rozpuštěna v 10 µl dH<sub>2</sub>O.

#### **3.2.5.4. Elektroforetické stanovení DNA na agarosovém gelu**

Pro elektroforetické stanovení DNA jsme si nejprve připravili agarosový gel (viz. níže). Do jeho jamek, vytvořených hřebínkem, byly aplikovány vzorky a standardy (100 bp DNA ladder, Hyperladder I, 1 kb plus DNA ladder). Gel byl ponechán působení elektrického pole o napětí 90 V po dobu 60 min, poté byl gel vyhodnocen pod UV-transiluminátorem.

Elektroforéza DNA byla provedena vždy po PCR k ověření syntézy fragmentů DNA, restrikčním štěpení fragmentů DNA a po klonování insertu do vektoru.

*Příprava agarosového gelu:* 0,6 g agarosy jsme povařili v 60 ml 0,5x TBE. Po zchladnutí roztoku na 50°C bylo následně přidáno 2,5 µl ethidium bromidu, poté byl roztok nalit do elektroforetické formy s hřebínkem a po ztuhnutí roztoku byl gel použit ke stanovení délky fragmentů DNA.

#### **3.2.5.5. Restrikční štěpení DNA**

Restrikční štěpení bylo provedeno pomocí vybraných restrikčních endonukleas (viz. 3.1.4. Enzymy). Reakční směs byla vždy inkubována při teplotě 37°C přes noc:

<b>Reakční směs</b>	fragment DNA, V (μl)	klonovací vektor, V (μl)
DNA	9	10
Restrikční pufr BamHI: 10x (s BSA)	3	2
RE 1	2	0,8
RE 2	2	0,8
dH <sub>2</sub> O	14	6,4
celkový objem reakční směsi	30	20

### 3.2.5.6. Odstranění fosfátových skupin klonovacích vektorů

Odstanění fosfátových skupin bylo provedeno pomocí alkalické fosfatasy dle protokolu:

<b>Reakční směs</b>	V(μl)
DNA (klonovací vektor)	10
pufr pro alkalickou fosfatasu: 10x	2
alkalická fosfatasa: FastAP	1
dH <sub>2</sub> O	7
celkový objem reakční směsi	20

Reakční směs byla inkubována 10 min při 37°C a následně 5 min při 75°C pro inhibici alkalické fosfatázy.

### 3.2.5.7. Klonování insertů do vektorů

Fragmenty DNA byly klonovány do příslušných vektorů (Kap. 3.1.3. Klonovací vektory).

Reakční směs byla inkubována při teplotě 16 °C přes noc. Standardní průběh reakce:

<b>Reakční směs</b>	V(μl)
produkt PCR	1
ligační pufr: 10x	2
klonovací vektor (pPD95.67, pCRII TOPO, pPD49.78, pPD49.83)	3
ligasa T4 DNA	2
dH <sub>2</sub> O	12
celkový objem reakční směsi	20

### **3.2.5.8. Transformace kompetentních buněk teplotním šokem**

Eppendorfova zkumavka s 50  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli TOP 10* a Eppendorfova zkumavka s 10  $\mu$ l ligačního mixu, připraveného klonováním insertu do plasmidu, byly zvlášť ponechány na ledu po dobu cca 15 min. Poté byla ligační směs přidána ke kompetentním buňkám, směs byla jemně promíchána pipetou a ponechána ve zkumavce na ledu 20 min. Následně byla zahřáta po dobu 1 min při teplotě 42°C („teplotní šok“) ve vodní lázni a byla opět přenesena na 2 min na led. Ke směsi bylo přidáno 500  $\mu$ l sterilního LB media a zkumavka byla inkubována při 37°C. Po 60 min byla směs nanесena na suché LB agarové misky, na které bylo předem nanесeno 250  $\mu$ l ampicilinu (100 mg/ml). Misky byly ponechány přes noc při teplotě 37°C v inkubátoru.

Následující den byly pro každý vzorek vybrány vhodné samostatně rostoucí kolonie, které byly použity pro přípravu minikultur kompetentních buněk *TOP 10*. Vybrané kolonie byly ve sterilním prostředí odebrány z agarových ploten pomocí sterilního párátko a pinzety a byly přeneseny otřením kolonie o stěnu do zkumavky se 4 ml LB media 4  $\mu$ l Amp (100 mg/ml). Zkumavky byly promíchány a inkubovány přes noc při 37°C na třepačce. LB medium s narostlou bakteriální kulturou bylo následně podrobено minipreparaci plasmidové DNA.

### **3.2.5.9. Isolace plasmidové DNA**

K minipreparaci plasmidové DNA byla použita souprava pro minipreparaci plasmidové DNA firmy *Bio Basic Ing* (Markham, Kanada). Postup byl proveden podle návodu výrobce.

### **3.2.5.10. Stanovení koncentrace nukleových kyselin**

Koncentrace a čistota DNA/RNA byly určeny měřením absorpance při 260 a 280 nm pomocí přístroje NanoDrop. Kontaminace DNA/RNA proteiny byla určena z podílu A260/A280. Rozmezí tohoto poměru 1,8 – 2,0 udává přijatelnou čistotu DNA/RNA.

### **3.2.5.11. Stanovení sekvence DNA**

Sekvence DNA byly stanoveny v Laboratoři sekvenace DNA na Ústavu dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

### **3.2.5.12. Příprava transgenních linií *C. elegans* mikroinjikováním**

Transgenní linie *C. elegans* byly získány mikroinjikováním příslušných plasmidů do gonád organismu. Mikroinjekce byly provedeny pomocí mikroskopu Olympus Inverted System Microscope IX70 vybaveným Narishige Mikromanipulátorem (Olympus, Tokyo, Japan). Mikroinjekce provedla Hana Prouzová z Laboratoře molekulární biologie a genetiky na ÚBBP. Plasmidová DNA s konstruktem o koncentraci 1 µg/µl byla injikována společně s plasmidem pRF4 o koncentraci 1 µg/µl do syncytia vaječníků mladého dospělého N2 hermafrodita.

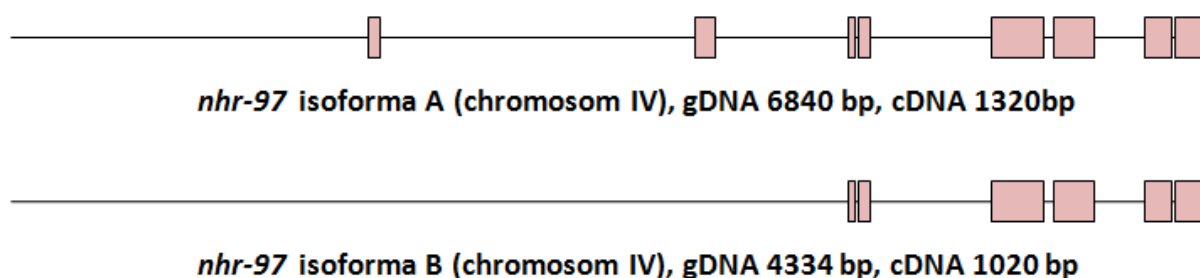
### **3.2.5.13. Mikroskopie transgenních linií *C. elegans***

Injikovaní hermafrodité *C. elegans* byli umístěni na NGM plotny a jejich potomstvo bylo sledováno pod lupou a byly vybírání ti potomci, u kterých docházelo k expresi pRF4. Exprese byla rozpoznána na základě „rolování“ potomků. Transgenní hermafrodité nesoucí specifický konstrukt DNA obsahující mimo jiné gen pro GFP, byli sledováni na NGM plotnách pomocí mikroskopu Olympus SZX12 Stereomicroscope System s přidaným fluorescenčním světlem. Exprese GFP byla dokumentována fotografováním na mikroskopu BX60 vybaveným kamerou Olympus DP30BW. Pro fotografování byly hlístice přeneseny na podložní sklíčko s 2% agarosou, kapkou vody a 10% azidem sodným. Azid sodný slouží k znehybnění a umrtvení hádátka, což je nezbytné k získání kvalitní fotografické dokumentace.

## 4 Výsledky

### 4.1 Charakterizace genu *nhr-97* *C. elegans*

*Nhr-97* *C. elegans* je lokalizován na IV. chromosomu a patří mezi doplňkové jaderné receptory (z *angl.* supplementary nuclear receptors, SupNRs) *C. elegans*. Gen má dvě isoformy. Isoforma A je dlouhá 6840 bp a je tvořena 8 exony o délce 1420 bp. Sekvence isoformy B má délku 4334 bp a je tvořena 6 exony o délce 1020 bp (Obr.13), [67].

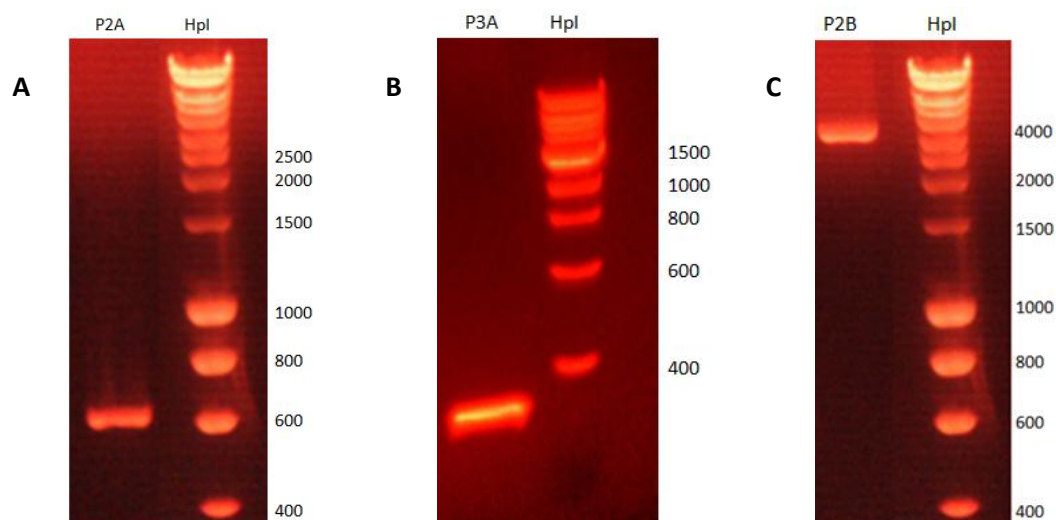


Obr.13: Schéma organizace exonů isoformy A a isoformy B genu *nhr-97* v genomu *C. elegans*. Gen je lokalizován na IV. chromosomu *C. elegans*.

### 4.2 Lokalizace exprese *nhr-97* v tkáních *C. elegans* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP)

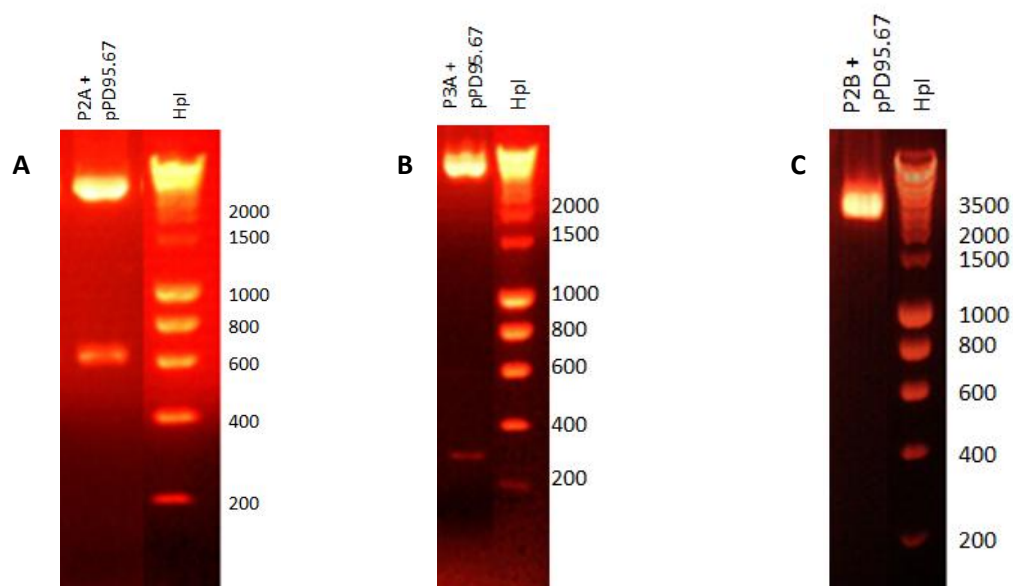
#### 4.2.1. Příprava fúzního plasmidu s navrženými promotory *nhr-97*

Navržené konstrukty obsahující promotory P2A, P3A a P2B pro studium exprese *nhr-97* v modelovém organismu *C. elegans* o délce 637 bp, 288 bp a 4162 bp (Obr.9) byly připraveny z gDNA izolované ze směsi vývojových stádií *C. elegans*. gDNA byla použita pro amplifikaci navržených sekvencí DNA metodou PCR. Amplifikace produktů byla ověřena elektroforézou DNA na agarosovém gelu (Obr.14).



Obr.14: Fragmenty P2A (A, 637 bp), P3A (B, 288 bp) a P2B (C, 4162 bp) *nhr-97* isoformy A a B navržené pro studium exprese genu v tkáních *C. elegans* po amplifikaci metodou PCR. Použitým standardem byl Hyper Ladder I.

Amplifikované sekvence DNA byly použity pro zaklonování do plasmidu pPD95.67, navrženého specificky pro studium exprese genu v *C. elegans* (Kap.3.1.3. Klonovací vektory). Pro ověření zaklonování fragmentů DNA do plasmidu byla provedena elektroforéza DNA na agarosovém gelu (Obr.15) a sekvenování připravených plasmidů.



Obr.15: Fragmenty P2A (A, 637 bp), P3A (B, 288 bp) a P2B (C, 4162 bp) *nhr-97* isoformy A a B zaklonované do plasmidu pPD95.67. Použitým standardem byl Hyper Ladder I.

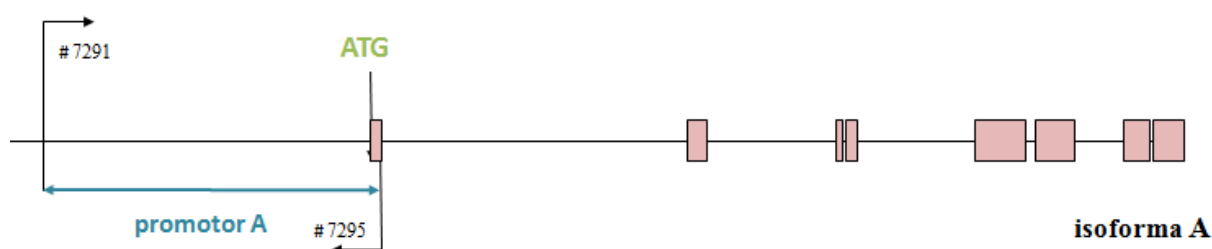


Plasmidová DNA se zaklonovaným konstruktem DNA *nhr-97* isoformy A a B byla mikroinjikována do gonád *C. elegans* tak, jak je popsáno v Kap. 3.2.5.12. Příprava transgenních linií *C. elegans* mikroinjekováním. Detekce transgenních potomků a dokumentace exprese genu byla provedena tak, jak je popsáno v Kap. 3.2.5.13. Mikroskopie transgenních linií *C. elegans*. U těchto potomků byla exprese *nhr-97* v tkáních *C. elegans* detekována pomocí GFP ve všech jeho vývojových stádiích.

#### 4.2.2. Detekce exprese *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP PA C. elegans* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu

Expres *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP PA C. elegans* byla lokalizována pomocí GFP v buňkách střeva, v hypodermis, v neuronech v oblasti hlavy a v oblasti ocasu (Obr.16).

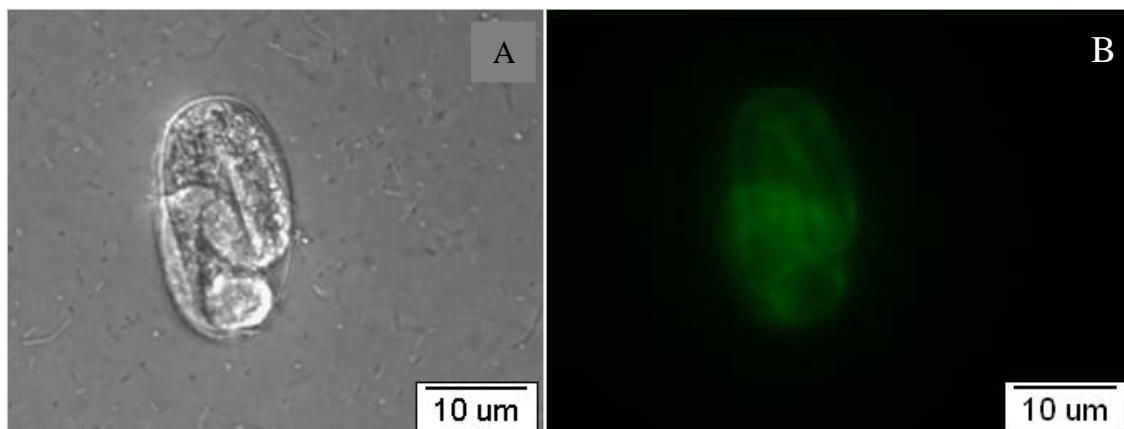
Kultivace injikovaných hermafroditů *C. elegans* a dokumentace exprese je popsána v kapitole 3.2.5.13 Mikroskopie transgenních linií *C. elegans*.



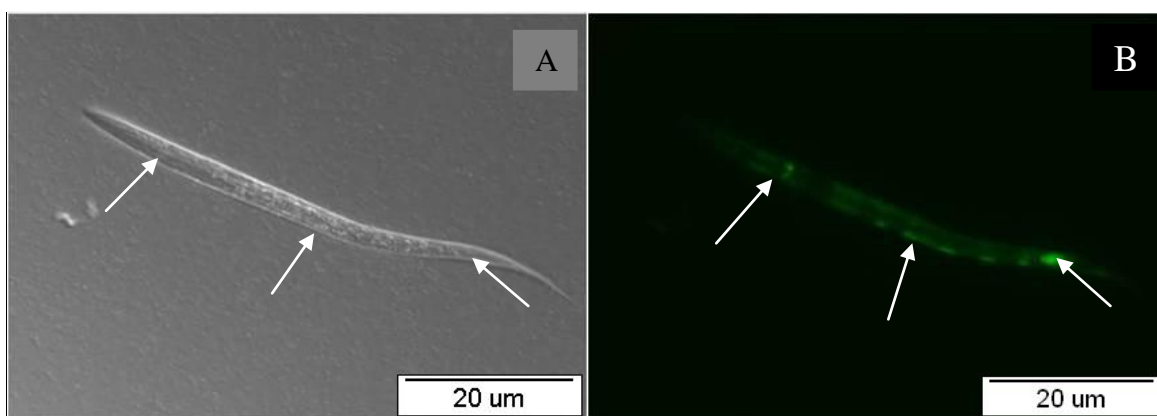
Obr.16: Schéma genu *nhr-97* *C. elegans* isoformy A s vyznačenou oblastí promotoru PA (2150 bp), která byla použita pro přípravu transgenní linie *nhr-97::GFP PA C. elegans*. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

Expres *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2A* je detekována již v embryonálním stádiu *C. elegans*. V tomto stádiu je exprese *nhr-97::GFP* ubikvitní ve všech buňkách *C. elegans* (Obr.17). Během larválního vývoje L1 a L2 *C. elegans* je exprese genu výrazná v neuronech hlavy a ocasu, detekujeme ji však i v hypodermis a ve střevě (Obr.18, 19). U larválních stádií L3 a L4 pozorujeme expresi *nhr-97::GFP* v neuronech hlavy, v neuronech v oblasti ocasu, hypodermis a ve střevě (Obr.20, 21). V dospělém hermafroditovi se exprese genu nemění a dochází k ní stejně jako u předchozích stádií

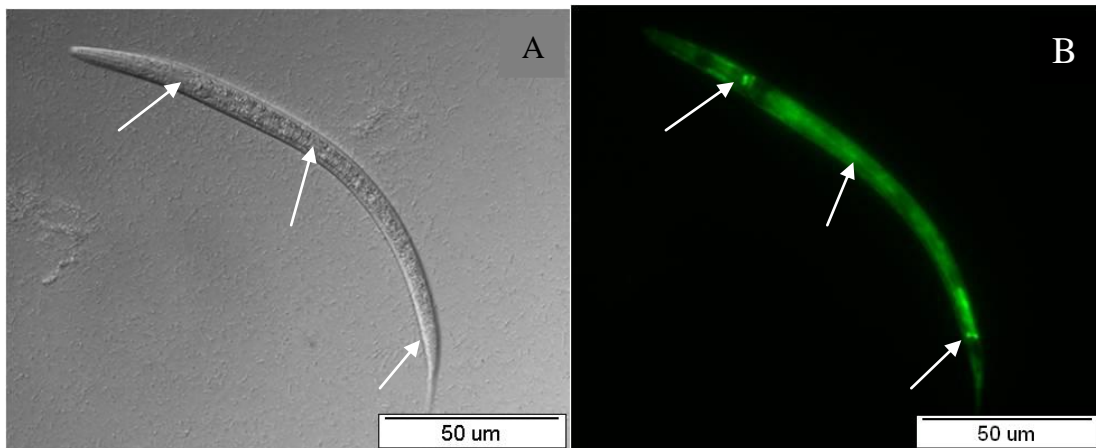
v neuronech v oblasti korpusu a druhé zaoblené části hltanu, v neuronech v oblasti ocásku, v hypodermis a ve střevě (Obr.21, 22).



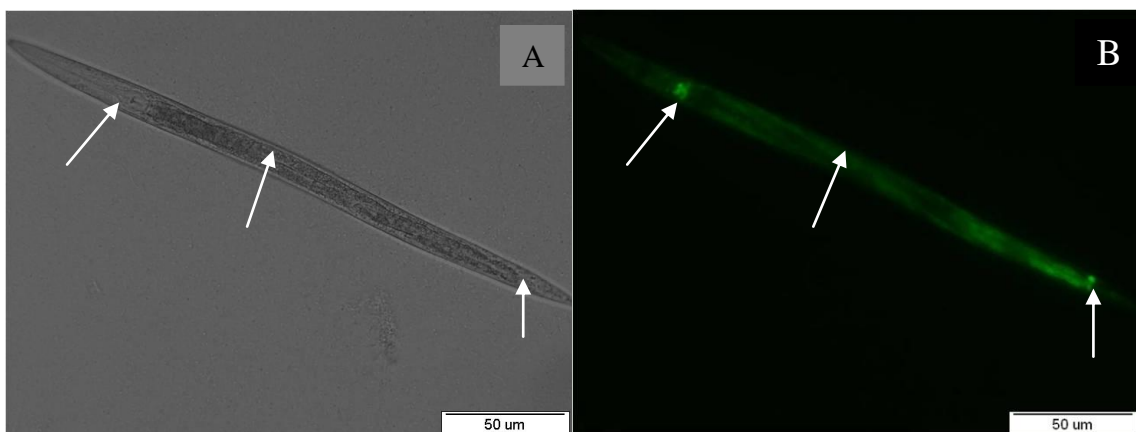
Obr.17: Embryo transgenní linie *nhr-97::GFP* PA *C. elegans* ve stádiu trojího ohnutí. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* v embryu byla ubikvitní ve všech jeho buňkách (B).



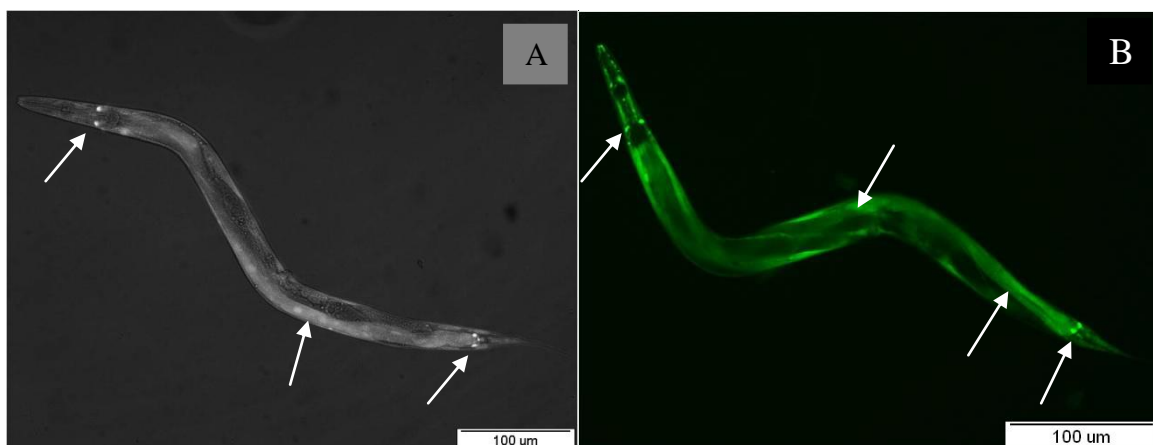
Obr.18: Larvální stádium L1 transgenní linie *nhr-97::GFP* PA *C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v neuronech hlavy (šipky vlevo), v neuronech v oblasti ocásku (šipky vpravo), v hypodermis a ve střevě (šipky uprostřed).



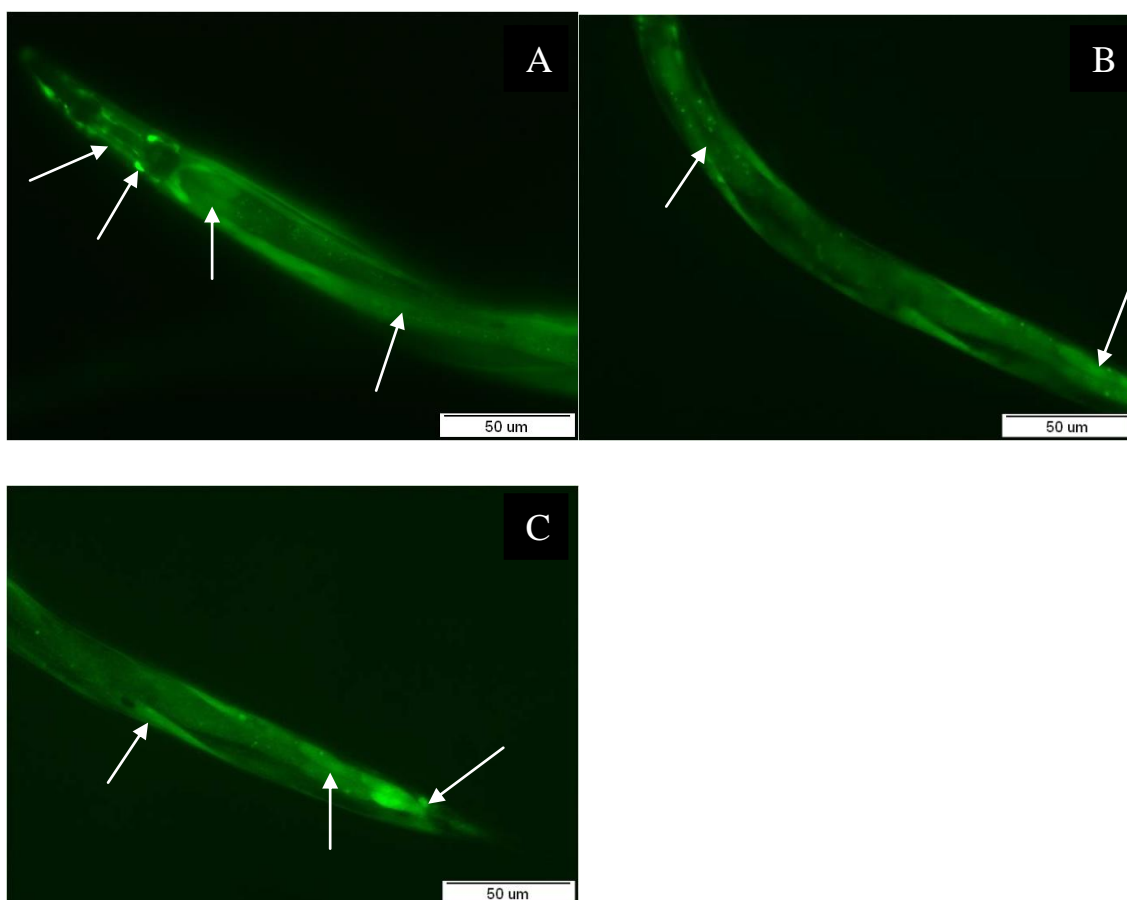
Obr.19: Larvální stádium L2 transgenní linie *nhr-97::GFP PA C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v neuronech hlavy (šipky vlevo), v neuronech v oblasti ocásku (šipky vpravo), v hypodermis a ve střevě (šipky uprostřed).



Obr.20: Larvální stádium L3 transgenní linie *nhr-97::GFP PA C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v neuronech hlavy (šipky vlevo), v neuronech v oblasti ocásku (šipky vpravo), v hypodermis a ve střevě (šipky uprostřed).



Obr.21: Larvální stádium L4 (A) a dospělí jedinec (B) transgenní linie *nhr-97::GFP PA C. elegans*. Obrázek A i B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v neuronech hlavy (šipky vlevo), v neuronech v oblasti ocásku (šipky vpravo), v hypodermis (šipka uprostřed vlevo, obr.B) a ve střevě (A, šipka uprostřed; B, šipka uprostřed vpravo).

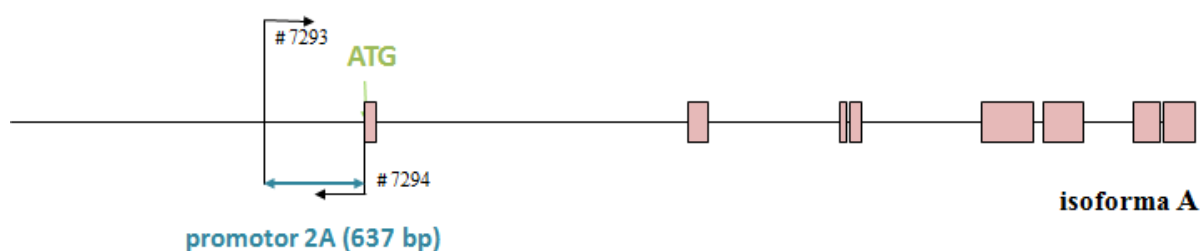


Obr.22: Detailní pohledy na hlavu (A), tělo (B) a ocásek (C) transgenní linie *nhr-97::GFP* P2A *C. elegans*. Obr. A, B i C byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. K expresi *nhr-97::GFP* v hlavové části *C. elegans* (A) dochází v neuronech okolo korpusu hltanu (šipka vlevo) a v druhé zaoblené části hltanu (šipka uprostřed vlevo), expresi na tomto obrázku pozorujeme i ve střevě (šipka uprostřed vpravo) a v hypodermálních buňkách (šipka vpravo). Na obrázku B a C vidíme detailní pohled exprese *nhr-97::GFP* v hypodermis (šipky vlevo) a ve střevě (B, šipka vpravo; C, šipka uprostřed). Ve střevě i v hypodermálních buňkách jsou vidět jádra buněk. Na obrázku C vidíme expresi v neuronech v oblasti ocásku (šipka vpravo).

#### 4.2.3. Detekce exprese *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP* P2A *C. elegans* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu

Expres *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP* P2A *C. elegans* byla lokalizována pomocí GFP v buňkách střeva, v hypodermis, v neuronech v oblasti hltanu a v distální části střeva (Obr.23).

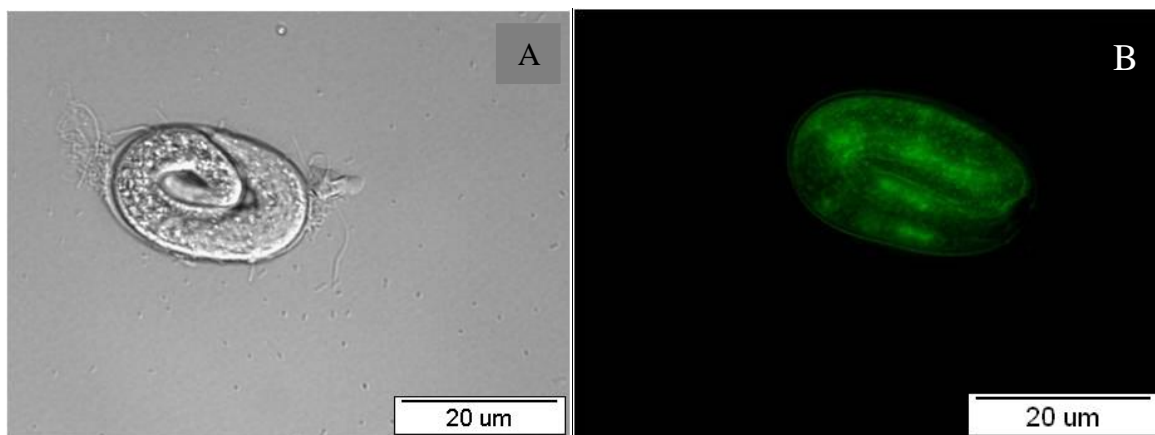
Kultivace injikovaných hermafroditů *C. elegans* a dokumentace exprese je popsána v kapitole 3.2.5.13 Mikroskopie transgenních linií *C. elegans*.



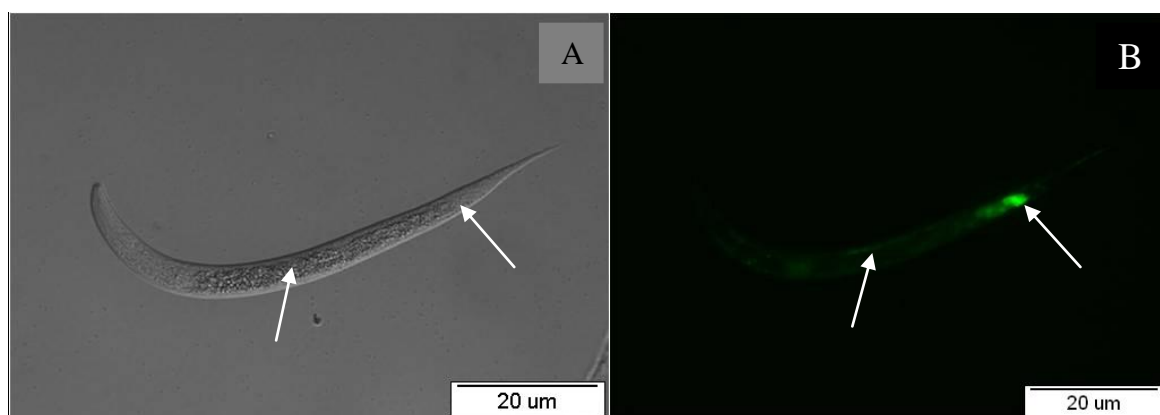
Obr.23: Schéma genu *nhr-97* *C. elegans* isoformy A s vyznačenou sekvencí promotoru P2A (637 bp), která byla použita pro přípravu transgenní linie *nhr-97::GFP* P2A *C. elegans*. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

Expres *nhr-97::GFP* v transgenní linii *nhr-97::GFP* P2A je detekována již v embryonálním stádiu *C. elegans*. V tomto stádiu je expres *nhr-97::GFP* pozorována ubikvitně ve všech buňkách *C. elegans* (Obr.24). Během larválního vývoje L1 a L2 *C. elegans* je expres genu výrazná v distální části střeva a pozorujeme i expresi (slabší

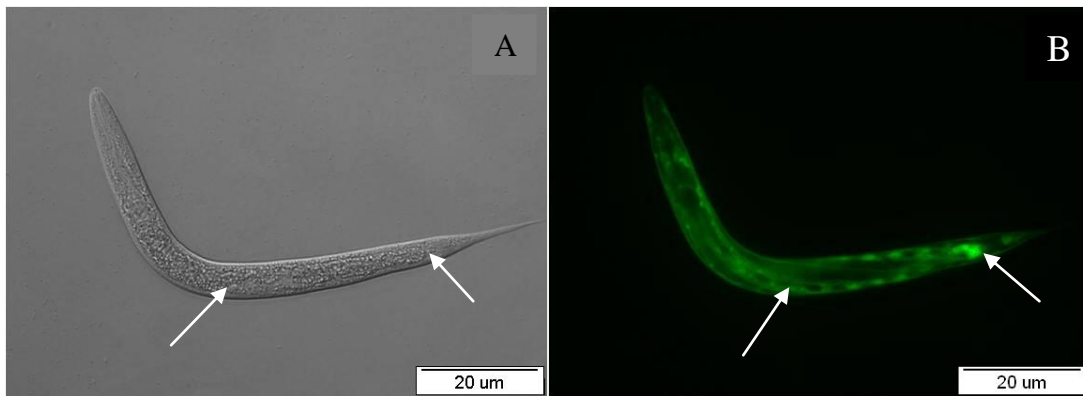
expresi u stádia L1) v hypodermis (Obr.25, 26). U larválních stádií L3 a L4 a u dospělé již pozorujeme výraznou expresi v hypodermis a v distální části střeva (Obr.27, 28, 29, 30). Tato transgenní linie se od linie *nhr-97::GFP* PA *C. elegans* liší tím, že v ní nepozorujeme žádnou expresi v hlavových a ocasních neuronech jako u linie *nhr-97::GFP* PA *C. elegans*.



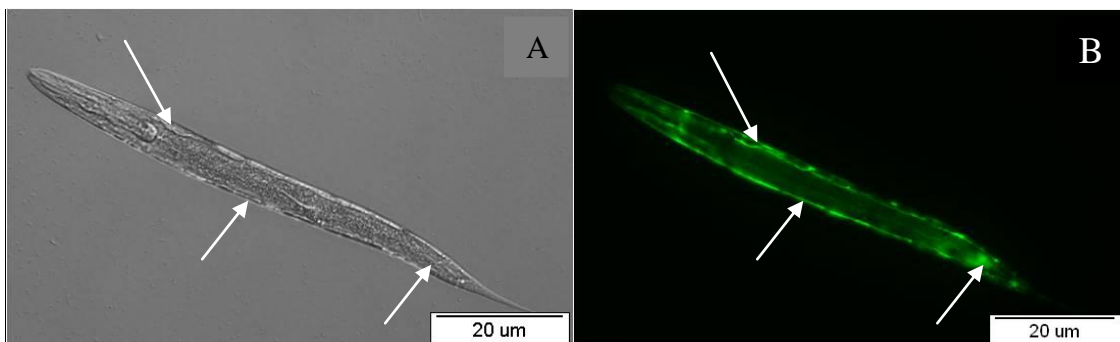
Obr.24: Embryo transgenní linie *nhr-97::GFP* P2A *C. elegans* ve stádiu trojího ohnutí. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Expresi *nhr-97::GFP* v embryu byla pozorována ubikvitně ve všech jeho buňkách (B).



Obr.25: Larvální stádium L1 transgenní linie *nhr-97::GFP* P2A *C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Expresi *nhr-97::GFP* byla detekována velmi slabě v hypodermis (šipky vlevo) a v distální části střeva (šipky vpravo).

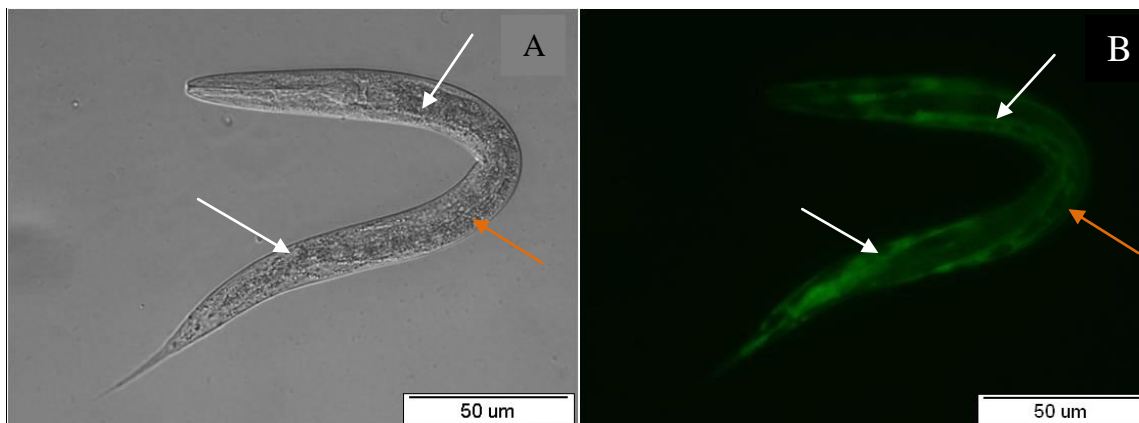


Obr.26: Larvální stádium L2 transgenní linie *nhr-97::GFP P2A C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v hypodermis (šipky vlevo) a v distální části střeva (šipky vpravo).

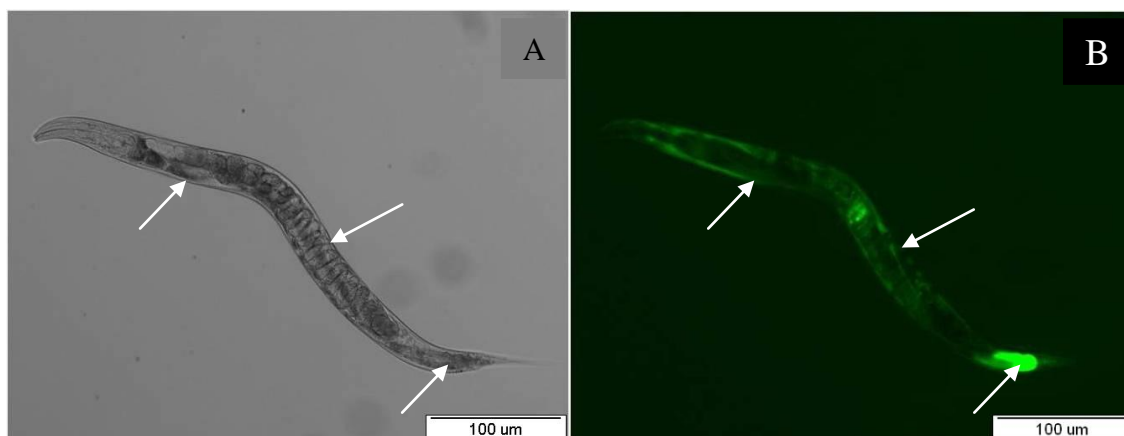


Obr.27: Larvální stádium L3 transgenní linie *nhr-97::GFP P2A C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Velmi výrazná exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v hypodermis (označují šipky vlevo a uprostřed) a v distální části střeva (šipky vpravo).



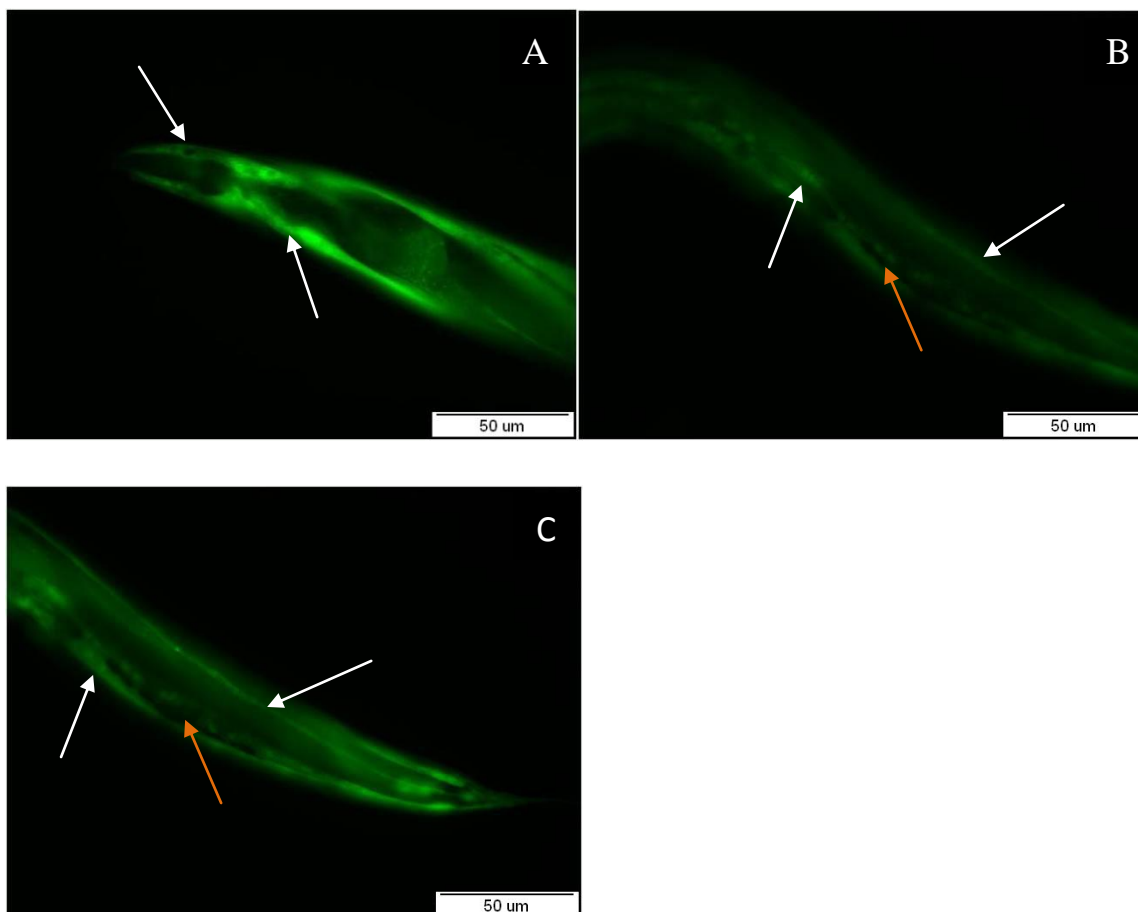


Obr.28: Larvální stádium L4 transgenní linie *nhr-97::GFP P2A C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována především v hypodermis (označeno bílými šipkami). Tmavé buňky v exprimující hypodermis jsou tzv. švové buňky, ve kterých k expresi *nhr-97* nedochází (z angl. seam cells, označuje oranžová šipka).



Obr.29: Dospělý jedinec transgenní linie *nhr-97::GFP P2A C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v hypodermis (šipky vlevo a uprostřed) a v distální části střeva (šipky vpravo).

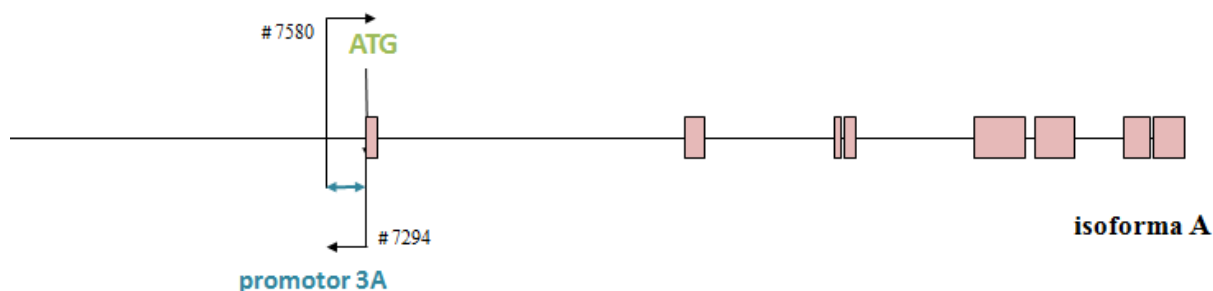




Obr.30: Detailní pohledy na hlavu (A), tělo (B) a ocásek (C) transgenní linie *nhr-97::GFP* P2A *C. elegans*. Obrázek A, B i C byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v hypodermis (A, B, C, označeno šipkami). Tmavé buňky v exprimující hypodermis jsou tzv. švové buňky (z angl. seam cells, označují oranžové šipky). Na obrázku B a C jsou vidět jádra hypodermálních buněk.

#### 4.2.4. Detekce exprese *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP* P3A *C. elegans* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu

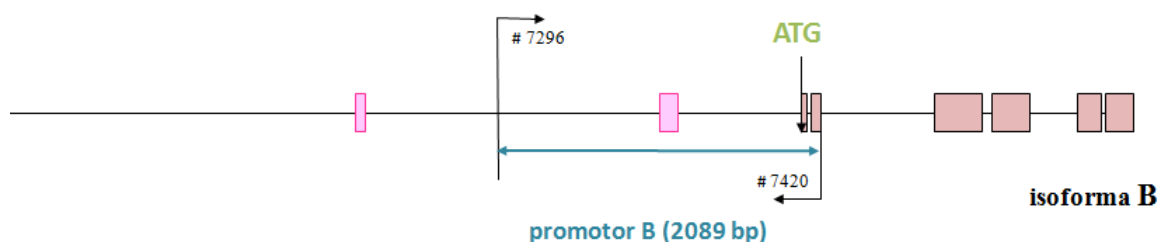
Exprese *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP* P3A *C. elegans* nebyla lokalizována. U „rolujících“ se potomků jsme nezjistili expresi v žádné z jejich tkání. Gen nebyl v tomto případě v organismu exprimován pravděpodobně z důvodu příliš krátké sekvence promotoru, která byla navržena a připravena pro studium exprese *nhr-97* isoformy A (Obr.31).



Obr.31: Schéma genu *nhr-97* *C. elegans* isoformy A s vyznačenou sekvencí promotoru P3A (288 bp), která byla použita pro přípravu transgenní linie *nhr-97::GFP* P3A *C. elegans*. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

#### 4.2.5. Detekce exprese *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP* PB *C. elegans* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu

Expres *nhr-97* u transgenní linie *nhr-97::GFP* PB *C. elegans* nebyla lokalizována. U „rolujících“ se potomků jsme nezjistili expresi v žádné z jejich tkání. Gen nebyl v tomto případě v organismu exprimován pravděpodobně z důvodu příliš krátké sekvence promotoru, která byla navržena a připravena pro studium exprese *nhr-97* isoformy B (Obr.32).

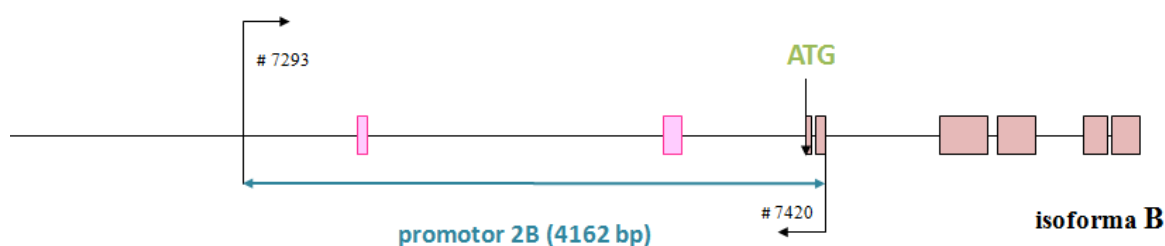


Obr.32: Schéma genu *nhr-97* *C. elegans* isoformy B s vyznačenou sekvencí promotoru PB (2089 bp), která byla použita pro přípravu transgenní linie *nhr-97::GFP* PB *C. elegans*. Exony isoformy B jsou zobrazeny černým orámováním. Pro lepší představu navržené sekvence promotoru PB jsou světlým orámováním zobrazeny první dva exony isoformy A. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

#### 4.2.6. Detekce exprese *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu

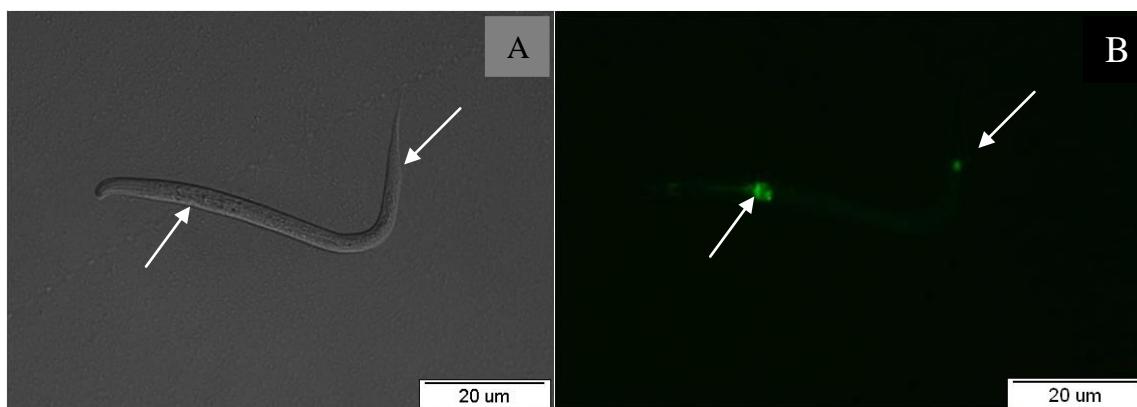
Expres *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans* byla lokalizována pomocí GFP v buňkách hltanu, hlavové mesodermální buňce, v neuronech v oblasti hltanu a v análním svěrači (Obr.33).

Kultivace injikovaných hermafroditů *C. elegans* a dokumentace exprese je popsána v kapitole 3.2.5.13 Mikroskopie transgenních linií *C. elegans*.

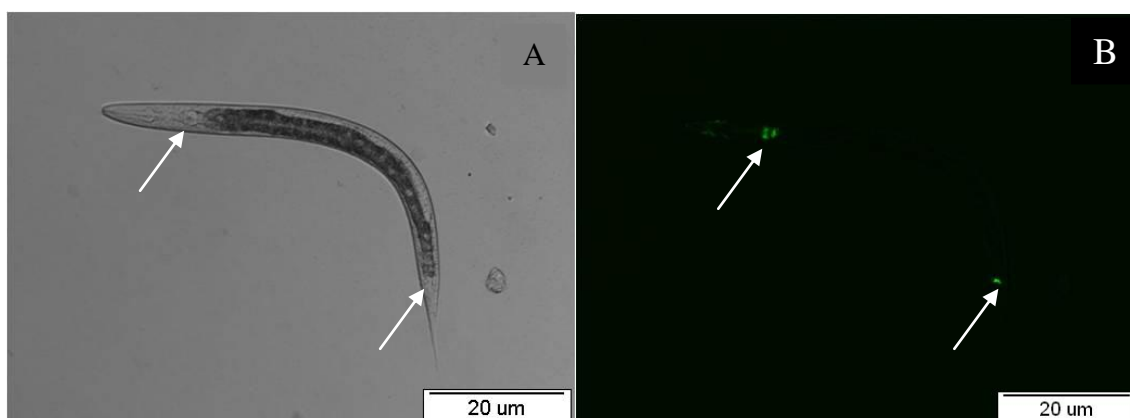


Obr.33: Schéma genu *nhr-97 C. elegans* isoformy B s vyznačenou sekvencí promotoru P2B (4162 bp), která byla použita pro přípravu transgenní linie *nhr-97::GFP P2B C. elegans*. Exony isoformy B jsou zobrazeny černým orámováním. Pro lepší představu navržené sekvence promotoru PB jsou světlým orámováním zobrazeny první dva exony isoformy A. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

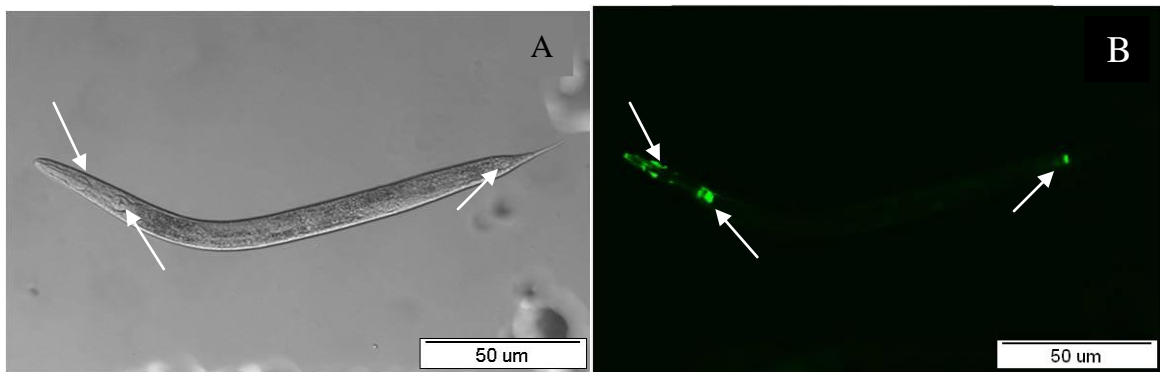
Expres *nhr-97* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B* v embryonálním stádiu *C. elegans* nebyla detekována. Během larválního vývoje L1 a L2 *C. elegans* je expres genu výrazná v hltanu a v neuronech v oblasti ocásku (Obr.34, 35). U larválních stádií L3 a L4 již pozorujeme výraznou expresi i v neuronech v oblasti korpusu hltanu (Obr.36, 37). V dospělém hermafroditovi je expres *nhr-97::GFP* viditelná ve stejné míře v hltanu, a to především v zúžené části hltanu a v druhé zaoblené části hltanu, v neuronech okolo korpusu, v análním svěrači a nově je pozorovatelná v hlavové mesodermální buňce (Obr.37, 38).



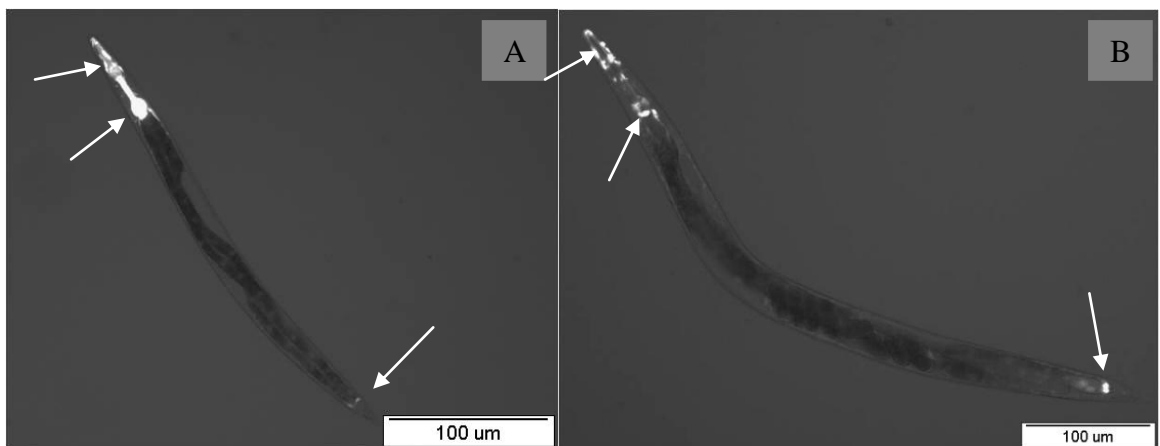
*Obr.34: Larvální stádium L1 transgenní linie nhr-97::GFP P2B C. elegans. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese nhr-97::GFP byla detekována v hltanu (šipky vlevo) a v análním svěrači (šipky vpravo).*



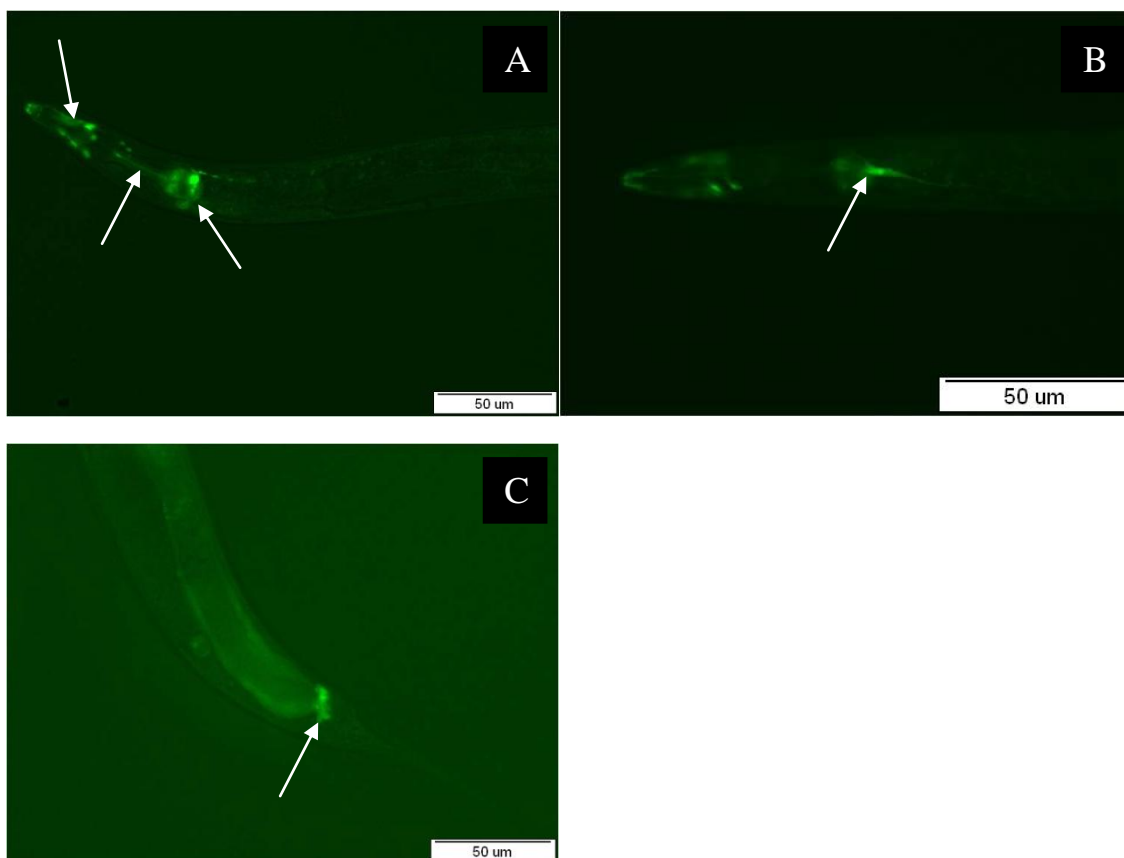
*Obr.35: Larvální stádium L2 transgenní linie nhr-97::GFP P2B C. elegans. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese nhr-97::GFP byla detekována v hltanu (šipka vlevo) a v análním svěrači (šipka vpravo).*



Obr.36: Larvální stádium L3 transgenní linie *nhr-97::GFP P2B C. elegans*. Obrázek A byl fotografován pomocí Nomarského hranolu, obrázek B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v hltanu (šipky uprostřed) a v neuronech okolo korpusu hltanu (šipky vlevo) a v análním svěrači (šipky vpravo).



Obr.37: Larvální stádium L4 (A) a dospělý jedinec (B) transgenní linie *nhr-97::GFP P2B C. elegans*. Obrázek A i B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v neuronech v oblasti korpusu hltanu (šipky vlevo), v druhé zaoblené části hltanu (šipky uprostřed), a v análním svěrači (šipky vpravo).



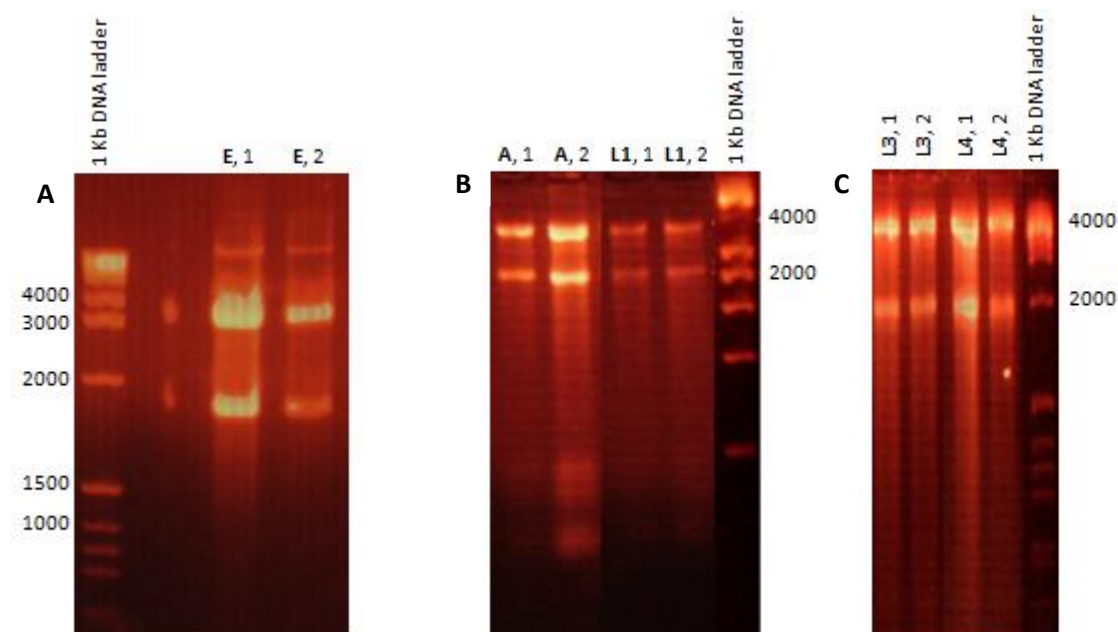
Obr.38: Detailní pohledy na hlavu (A, B) a ocásek (C) transgenní linie *nhr-97::GFP* P2B *C. elegans*. Obrázek A, B i C byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T. Exprese *nhr-97::GFP* byla detekována v hlavě *C. elegans* (A) v oblasti zúžení hltanu (A, šipka uprostřed), v druhé zaoblené části hltanu (A, šipka vpravo) a v neuronech okolo korpusu hltanu (A, šipka vlevo). Výrazná exprese je také v hlavové mesodermální buňce *C. elegans* (B, označena šipkou) a v análním svěrači (C, označena šipkou).

### 4.3 Stanovení exprese mRNA *nhr-97* v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans* pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)

#### 4.3.1. Příprava cDNA z jednotlivých vývojových stádií *C. elegans* pro qPCR

Komplementární DNA byla připravena pomocí reverzní transkriptasy přepisem izolované RNA (Obr.39) z jednotlivých vývojových stádií *C. elegans*. Připravená cDNA byla použita pro měření množství exprimovaného *nhr-97* (na úrovni mRNA) v jednotlivých vývojových

stádiích *C. elegans* metodou kvantitativní PCR.



Obr.39: Vzorky nukleových kyselin po reakci s DNasou. RNA izolovaná z embryí E1, E2 (A), larev L1, L2 (B), L3, L4 (C) a dospělých hermafroditů A1, A2 (B). Na obrázcích je patrná RNA velké a malé ribozomální podjednotky. Použitým standardem byl 1kb DNA ladder.

#### 4.3.2. Expres mRNA *nhr-97* isoformy A+B v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans*

Expres *nhr-97* byla měřena metodou qPCR za účelem ověření exprese a zjištění míry exprese genu v jednotlivých stádiích *C. elegans*. Byla provedena dvě měření, jedno pro obě isoformy A+B *nhr-97* a druhé pouze pro isoformu A *nhr-97*, abychom zjistili, zda se bude množství exprese genu v isoformě A lišit od množství exprese genu v obou isoformách (Obr.9).

Pro vyjádření množství exprimovaného genu v daném vývojovém stádiu *C. elegans* jsme vypočetli hodnoty  $f_{\text{norm.}}$ ,  $C_{\text{p norm.}}$  a  $\Delta C_{\text{p}}$ . (Kap. 3.2.2.4. Kvantitativní polymerázová reakce (qPCR), vzorečky I, II, III).  $C_{\text{p}}$  studovaného genu je nepřímě úměrné množství templátu přítomného na začátku reakce a množství tohoto templátu přímo odpovídá množství mRNA v původním vzorku použitém pro přípravu cDNA. Tabulka 4 uvádí prahové

hodnoty cyklů Cp zjištěné během kvantitativní PCR *nhr-97* isoformy A+B s referenčním genem *ama-1* pro jednotlivá vývojová stádia *C. elegans*. Z hodnot Cp byly vypočteny hodnoty normalizačního faktoru  $f_{\text{norm.}}$ , prahové hodnoty cyklů normalizované k referenčnímu genu *ama-1*  $C_{p_{\text{norm.}}}$ ,  $\Delta C_p$  a  $2^{\Delta C_p}$ . Hodnoty  $2^{\Delta C_p}$  pro každé vývojové stádium (se směrodatnými odchylkami), které byly použity pro vyjádření exprese mRNA *nhr-97* isoformem A+B v *C. elegans* jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab.4: Tabulka uvádí prahové hodnoty cyklů Cp zjištěné během tří samostatných experimentů qPCR *nhr-97* isoformy A+B s referenčním genem *ama-1* pro jednotlivá vývojová stádia *C. elegans*. Ze zjištěných hodnot Cp byly vypočteny hodnoty normalizačního faktoru  $f_{\text{norm.}}$ , normalizované prahové hodnoty cyklů  $C_{p_{\text{norm.}}}$ ,  $\Delta C_p$ ,  $2^{\Delta C_p}$ , potřebné pro vyjádření exprese mRNA *nhr-97* isoformem A+B u *C. elegans*.

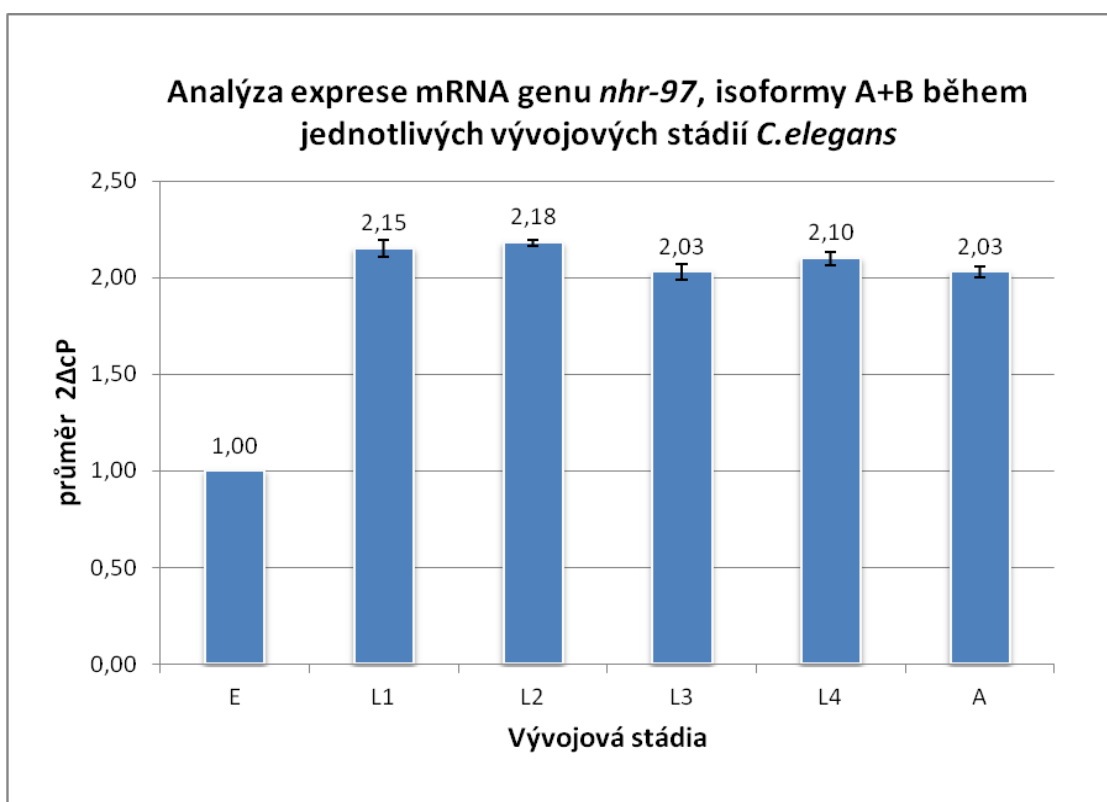
experiment 1						
vývojové stádium	Cp <i>nhr-97</i> A+B	Cp <i>ama-1</i>	$f_{\text{norm.}}$	$C_{p_{\text{norm.}}}$	$\Delta C_p$	$2^{\Delta C_p}$
E	21,54	25,86	1,0000	21,54	0,00	1,00
L1	20,33	26,79	0,9650	19,62	1,10	2,14
L2	20,22	27,14	0,9530	19,27	1,12	2,17
L3	21,61	27,38	0,9440	20,41	1,06	2,08
L4	21,11	26,90	0,9610	20,29	1,06	2,08
A	22,13	26,94	0,9600	21,24	1,01	2,01
experiment 2						
vývojové stádium	Cp <i>nhr-97</i> A+B	Cp <i>ama-1</i>	$f_{\text{norm.}}$	$C_{p_{\text{norm.}}}$	$\Delta C_p$	$2^{\Delta C_p}$
E	21,48	24,50	1,0000	21,48	0,00	1,00
L1	21,28	27,59	0,8880	18,90	1,14	2,20
L2	20,06	26,07	0,9398	18,85	1,14	2,20
L3	21,80	26,68	0,9183	20,02	1,07	2,01
L4	20,82	26,08	0,9394	19,56	1,10	2,14
A	22,11	26,25	0,9333	20,64	1,04	2,06
experiment 3						
vývojové stádium	Cp <i>nhr-97</i> A+B	Cp <i>ama-1</i>	$f_{\text{norm.}}$	$C_{p_{\text{norm.}}}$	$\Delta C_p$	$2^{\Delta C_p}$
E	21,76	25,89	1,0000	21,76	0,00	1,00
L1	20,74	26,69	0,9700	20,12	1,08	2,11
L2	20,56	27,28	0,9490	19,51	1,12	2,17
L3	20,82	26,58	0,9740	20,28	1,07	2,01
L4	20,76	26,26	0,9859	20,47	1,06	2,08
A	21,65	26,03	0,9946	21,53	1,01	2,01



Tab.5: Průměrné hodnoty  $2^{\Delta C_p}$  ze tří experimentů pro každé vývojové stádium *C. elegans* a směrodatné odchylky pro hodnoty  $2^{\Delta C_p}$ . Tyto hodnoty byly použité pro grafické vyjádření exprese *nhr-97* isoformem A+B v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans* (Graf 1).

vývojové stádium	průměr $2^{\Delta C_p}$	směrodatná odchylka
E	1,00	0,0000
L1	2,15	0,0458
L2	2,18	0,0173
L3	2,03	0,0404
L4	2,10	0,0346
A	2,03	0,0289

Z výsledků měření exprese mRNA metodou qPCR vyplývá, že k expresi *nhr-97* dochází ve všech vývojových stádiích *C. elegans* (Graf 1). Gen je nejméně exprimován ve stádiu embryonálním a zároveň můžeme říci, že jeho exprese v larválních stádiích a u dospělého jedince je téměř konstantní (Graf 1). Exprese *nhr-97* u larválního stádia L1 a L2 je však nejvyšší.



Graf 1: Vyjádření exprese mRNA *nhr-97* isoformem A+B v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans* pomocí hodnot  $2^{\Delta C_p}$  vypočtených z hodnot prahových cyklů  $C_p$  získaných během jednotlivých měření metodou qPCR.

### 4.3.3. Expresa mRNA *nhr-97* isoformy A v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans*

Úvodní text kapitoly 4.3.2. Expresa mRNA *nhr-97* isoformy A+B v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans*, je totožný i pro tuto kapitolu. Tabulka 6 uvádí prahové hodnoty cyklů Cp zjištěné během kvantitativní PCR *nhr-97* isoformy A s referenčním genem *ama-1* pro jednotlivá vývojová stadia *C. elegans*. Hodnoty  $2^{\Delta C_p}$  pro každé vývojové stádium se svými směrodatnými odchylkami, které byly použity pro vyjádření exprese mRNA *nhr-97* isoformy A v *C. elegans* jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab.6: Tabulka uvádí prahové hodnoty cyklů Cp zjištěné během dvou samostatných experimentů qPCR *nhr-97* isoformy A s referenčním genem *ama-1* pro jednotlivá vývojová stadia *C. elegans*. Ze zjištěných hodnot Cp byly vypočteny hodnoty normalizačního faktoru  $f_{norm.}$ , normalizované prahové hodnoty cyklů  $C_{p_{norm.}}$ ,  $\Delta C_p$ ,  $2^{\Delta C_p}$ , potřebné pro vyjádření exprese mRNA *nhr-97* isoformy A v *C. elegans*.

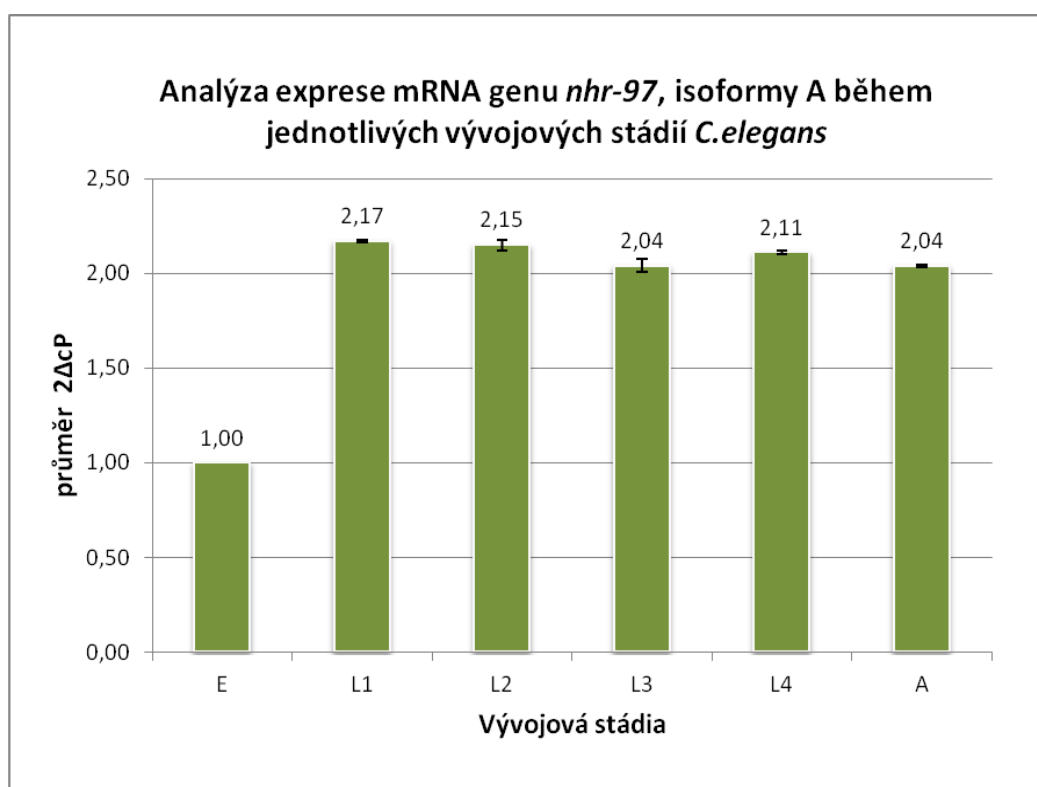
experiment 4						
vývojové stádium	Cp <i>nhr-97</i> A	Cp <i>ama-1</i>	$f_{norm.}$	$C_{p_{norm.}}$	$\Delta C_p$	$2^{\Delta C_p}$
E	22,57	19,97	1,0000	22,57	0,00	1,00
L1	21,82	21,47	0,9300	20,29	1,11	2,16
L2	21,58	21,28	0,9380	20,24	1,12	2,17
L3	22,00	20,76	0,9620	21,64	1,04	2,06
L4	22,03	20,80	0,9600	21,15	1,07	2,10
A	22,85	20,81	0,9600	21,94	1,03	2,04
experiment 5						
vývojové stádium	Cp <i>nhr-97</i> A	Cp <i>ama-1</i>	$f_{norm.}$	$C_{p_{norm.}}$	$\Delta C_p$	$2^{\Delta C_p}$
E	22,53	19,96	1,0000	22,53	0,00	1,00
L1	21,71	21,49	0,9290	20,17	1,12	2,17
L2	21,69	21,43	0,9510	20,63	1,09	2,13
L3	21,93	20,99	0,9650	21,16	1,07	2,01
L4	21,73	20,76	0,9610	20,88	1,08	2,11
A	22,98	20,82	0,9590	22,04	1,02	2,03

Tab.7: Průměrné hodnoty  $2^{\Delta C_p}$  ze tří experimentů pro každé vývojové stádium *C. elegans* a směrodatné odchylky pro hodnoty  $2^{\Delta C_p}$ . Tyto hodnoty byly použité pro grafické vyjádření exprese *nhr-97* isoformem A v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans* (Graf 2).

vývojové stádium	průměr $2^{\Delta C_p}$	směrodatná odchylka
E	1,00	0,0000
L1	2,17	0,0071
L2	2,15	0,0283
L3	2,04	0,0354
L4	2,11	0,0071
A	2,04	0,0071

Z výsledků měření exprese mRNA metodou qPCR vyplývá, že k expresi *nhr-97* isoformy A dochází ve všech vývojových stádiích *C. elegans*. Gen je nejméně exprimován ve stádiu embryonálním a zároveň je jeho exprese v larválních stádiích a u dospělého jedince téměř konstantní (Graf 2). Exprese *nhr-97* u larválního stádia L1 a L2 je však nejvyšší.

Expresa *nhr-97* obou isoformem A+B a samotné isoformy A jsou prakticky totožné.

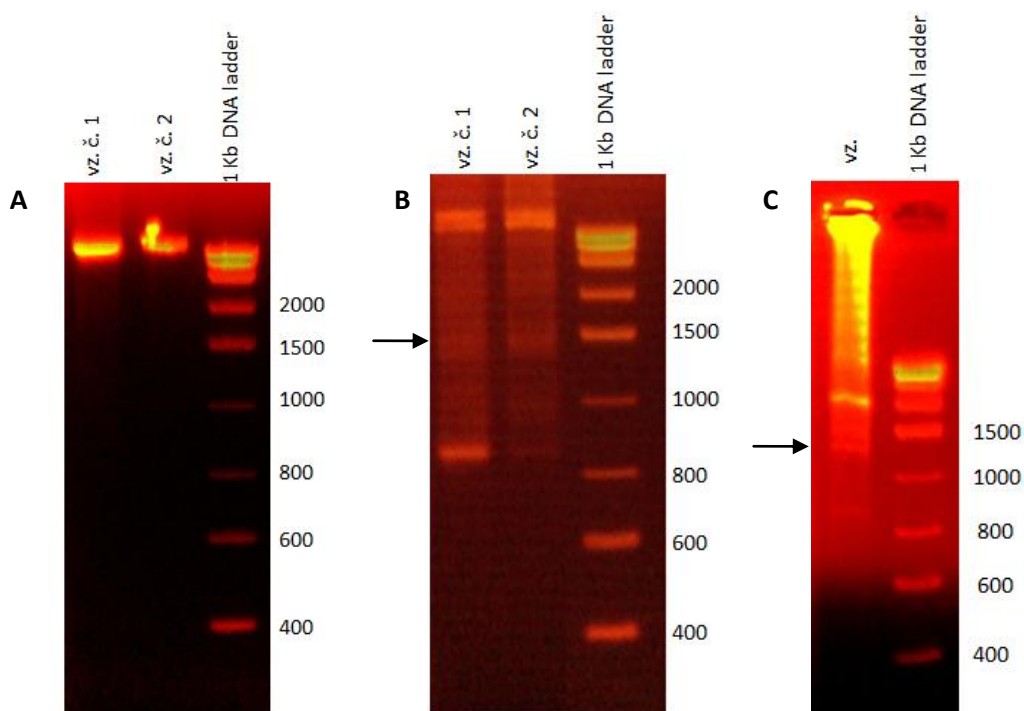


Graf 2: Vyjádření exprese mRNA *nhr-97* isoformem A v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans* pomocí hodnot  $2^{\Delta C_p}$  vypočtených z hodnot prahových cyklů  $C_p$  získaných během jednotlivých měření metodou qPCR.

#### 4.4 Studium vlivu inhibice *nhr-97* metodou RNA interference provedenou na divokém typu N2 *C. elegans*

Inhibice genu *nhr-97* byla provedena metodou RNA interference. Dvojvláknová RNA *nhr-97* (Kap.3.2.3. Inhibice *nhr-97* metodou RNA interference) byla připravena transkripcí z cDNA *in vitro*: Kap.3.2.3.1. Příprava konstruktu cDNA pro RNAi *nhr-97* a Kap.3.2.3.2. Příprava dsRNA. Následně byla dsRNA *nhr-97* mikroinjikována do gonád N2 *C. elegans* a byl studován vliv inhibice *nhr-97* na organismus (Kap. 3.2.3.3. Mikroinjekce dsRNA a studium vlivu RNAi na organismus *C. elegans*).

Obrázek elektroforetického gelu zobrazuje plasmidovou DNA po linearizaci plasmidu (Obr.40 A), ssRNA po transkripci *in vitro* (Obr.40 B) a dsRNA po tvorbě dvouvláknové RNA (Obr.40 C). Plasmidová DNA byla tvořena konstruktem cDNA (1320 bp) navrženým pro RNAi *nhr-97* a plasmidem pCRII TOPO. Vzorek č. 1 a vzorek č. 2 byly následně smíchány a po inkubaci při 70°C po dobu 10 min vznikla dvojvláknová RNA, která byla využita k mikroinjikování do gonád *C. elegans*.



Obr.40: Linearizovaná plasmidová DNA (A, vz.č.1, vz.č.2) tvořená konstruktem cDNA (1320 bp) navrženým pro RNAi *nhr-97* a plasmidem pCRII TOPO o celkové velikosti zhruba 5000 bp. Jednovláknová RNA (B, vz.č.1, vz.č.2, označuje šipka) po transkripci *in*

*in vitro* linearizovaného plasmidu o velikosti zhruba 1350 bp. Ve vzorcích (B) zůstal plasmid, který je vidět jako proužek o předpokládané velikosti cca 5000 bp. Obrázek C zobrazuje výslednou dsRNA o velikosti zhruba 1350 bp (C, označuje šipka) po sloučení ssRNA vz.č. 1 a vz.č. 2. Použitým standardem byl 1 Kb DNA ladder.

RNA interference genu *nhr-97* byla provedena s dsRNA *nhr-97* o c = 1 µg/µl. Z celkového počtu 25 injikovaných hermafroditů, kteří kladli potomky, bylo pro výpočty použito 14 z nich s celkovým počtem okolo a více jak 100 potomků (9 hermafroditů kladoucích podprůměrné množství potomků bylo z experimentu vyloučeno). Celkové množství nakladených potomků bylo 1822. Embryonální lethality byla přibližně 9 % (Tab.8). Během experimentu jsme nepozorovali žádné uhynulé larvy, ani změny fenotypu vyvíjejících se hermafroditů. Jedinci z vylíhnutých embryí prošli normálním vývojovým cyklem a po třech dnech kladly potomky.

Inhibice *nhr-97* v N2 *C. elegans* nevyvolala žádné výrazné změny vývoje nematod, změny fenotypu ani lethality embryí, či larev. Proto předpokládáme, že funkce *nhr-97* je buďto závislá na kooperaci s jiným, či jinými geny (transkripčními faktory), nebo je inhibice exprese tohoto genu substituována jiným transkripčním faktorem.

Tab.8: Tabulka uvádí souhrn dat získaných během RNAi *nhr-97* v N2 *C. elegans* probíhající při teplotě 22°C.

Injikovaný hermafrodit	Sledování potomci	Uhynulá embrya	Embryonální lethality (%)
1	118	15	12,71
2	91	26	28,57
3	106	2	1,89
4	169	15	8,88
5	135	22	16,30
6	108	1	0,93
7	184	8	4,35
8	72	7	9,72
9	156	15	9,61
10	181	14	7,73
11	175	14	8,00
12	125	3	2,40
13	96	1	1,04
14	106	12	11,32
	<b>Σ 1822</b>	<b>Σ 155</b>	<b>průměr 8,82%</b>

## 4.5 Studium vlivu inhibice *pha-4* metodou RNA interference provedenou v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B*

Vzhledem k tomu, že exprese *nhr-97* v hltanu transgenní linie *nhr-97::GFP P2B* je velmi silná, pokusili jsme se zjistit, zda je regulace transkripce genu *nhr-97* řízená genem *pha-4*/FoxA. *Pha-4* je transkripční faktor nezbytný pro vývoj hltanu v časném stádiu embryogeneze *C. elegans*.

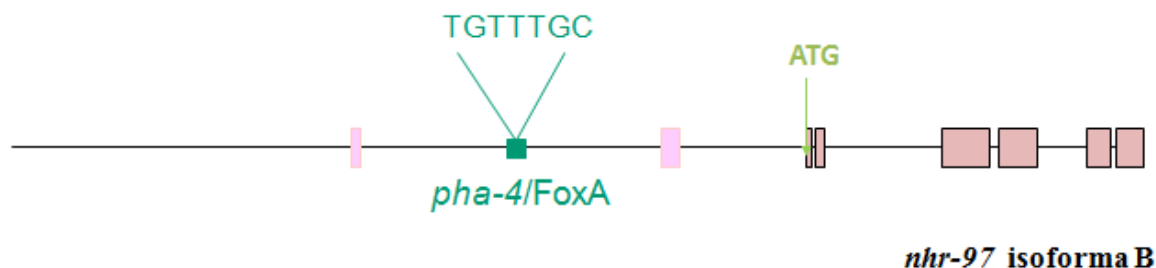
Růst a vývoj hltanu *C. elegans* závisí na koordinaci exprese genů zprostředkovaných *pha-4* v kombinaci s dalšími, většinou neznámými, transkripčními faktory. Důkazem, že mezi tyto faktory patří i skupina jaderných hormonálních receptorů je gen, který ovlivňuje vývoj svalů hltanu *daf-12/NHR*. Většina, možná všechny geny exprimované v různých typech buněk hltanu a v různých vývojových stádiích *C. elegans* jsou aktivovány přímo *pha-4*. Zároveň několik objevených transkripčních faktorů může působit i ve spojení s tímto proteinem [40].

Na základě znalostí, které máme o genu *pha-4*, jsme předpokládali, že transkripce *nhr-97* by mohla být regulovaná *pha-4* a/nebo, že tyto geny společně kooperují při regulaci transkripce jiného/jiných genů. Proto, abychom zjistili, zda *pha-4* reguluje transkripci *nhr-97* jsme se rozhodli najít jeho vazebnou sekvenci v promotorové oblasti obou isoform *nhr-97*. Zároveň jsme provedli inhibici *pha-4* metodou RNA interference v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B* a pozorovali jsme změny exprese *nhr-97* v hltanu hlístic. Následně jsme z výsledků tohoto experimentu usuzovali na případnou kooperaci transkripčních faktorů *nhr-97* a *pha-4*.

### 4.5.1. Nalezení vazebného místa v promotorové oblasti *nhr-97* isoformy A a B pro DNA vazebnou doménu *pha-4* bioinformatickými metodami

Sekvence DNA pro vazbu DNA vazebné domény (DBD) *pha-4* byly predikovány *in silico* jako TRTTKRY (R=A/G, K=G/T, Y=C/T), avšak pouze některé sekvence se ukázaly jako funkční *in vivo* v *C. elegans*. Jednou z těchto nejčastěji vyskytujících se sekvencí je TGTTCG [35].

Pomocí bioinformatických metod [76] jsme ověřili, že sekvence TGTTTGC se vyskytuje přímo v promotorové oblasti isoformy B *nhr-97* (Obr.41). Tato vazebná sekvence se v promotorové oblasti isoformy A *nhr-97* nenachází.



Obr.41: Schéma genu *nhr-97* *C. elegans* isoformy B s exony (orámované černě) a s vyznačeným vazebným místem pro *pha-4/FoxA* v promotorové oblasti. Sekvence DNA na kterou se váže vazebná doména DNA *pha-4* je TGTTTGC. Pro zřetelné znázornění výskytu vazebného místa pro *pha-4* pouze v oblasti promotoru isoformy B jsou exony isoformy A *nhr-97* označeny světlým orámováním.

#### 4.5.2. Provedení metody RNA interference *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans*

Inhibice genu *pha-4* (Kap.1.2. Transkripční faktor *pha-4*) byla provedena metodou RNA interference. Kódující oblast *pha-4* ve formě dsRNA byla připravena stejnými metodami (Kap. 3.2.3.1. Příprava konstruktů cDNA pro RNAi *nhr-97* a Kap. 3.2.3.2. Příprava dsRNA) jako dsRNA *nhr-97*. Následně byla dsRNA *pha-4* mikroinjikována do gonád transgenní linie *nhr-97::GFP P2B C. elegans* a byl studován vliv inhibice *pha-4* na změny exprese *nhr-97* v této linii (Kap. 3.2.3.3. Mikroinjekce dsRNA a studium vlivu RNAi na organismus *C. elegans*).

#### 4.5.3. Vyhodnocení dat získaných během RNA interference *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans*

Transgenní potomci byli kultivováni a sledováni, tak jak je uvedeno v Kap. 3.2.3.3. Mikroinjekce dsRNA a studium vlivu RNAi na organismus *C. elegans*.

Byly provedeny 3 experimenty RNAi s různými koncentracemi dsRNA *pha-4* při teplotě 22°C.

První experiment byl proveden s dsRNA *pha-4* o  $c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Z celkového počtu 12 injikovaných hermafroditů, kteří kladli potomky bylo pro výpočty použito 7 z nich s celkovým počtem okolo a více jak 100 potomků (5 hermafroditů kladoucích podprůměrné množství potomků bylo z experimentu vyloučeno). Celkové množství nakladených potomků bylo 994. Embryonální lethality byla 36,46% a larvální lethality ve stádiu L1 byla 9,06% (Tab.9). Zhruba po 96 hodinách došlo k úhynu všech nevyvinutých larev, jejichž vývoj se zastavil ve stádiu L1.

Tab.9: Tabulka uvádí souhrn dat získaných během RNAi *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans* probíhající při teplotě 22°C.

Injikovaný hermafrodit	Sledování potomci	Uhynulá embrya	Uhynulé larvy L1	Embryonální lethality (%)	Larvální lethality L1 (%)
1	214	80	10	37,38	4,67
2	96	38	5	39,58	5,20
3	99	31	15	31,31	15,51
4	109	39	9	35,78	8,27
5	103	34	10	33,00	9,71
6	218	93	17	42,66	7,80
7	155	55	19	35,48	12,26
	$\Sigma$ 994	$\Sigma$ 370	$\Sigma$ 85	průměr 36,46	průměr 9,06

Druhý experiment byl proveden s dsRNA *pha-4* v poměru 1:1 s dH<sub>2</sub>O. Z celkového počtu 14 injikovaných hermafroditů, kteří kladli potomky bylo pro výpočty použito 13 z nich. Celkové množství nakladených potomků bylo 2000. Embryonální lethality byla 48,28% a larvální lethality ve stádiu L1 byla 7,37% (Tab.10). Zhruba po 96 hodinách došlo k úhynu všech nevyvinutých larev, jejichž vývoj se zastavil ve stádiu L1.



Tab.10: Tabulka uvádí souhrn dat získaných během RNAi *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans* probíhající při teplotě 22°C. Koncentrace dsRNA byla v tomto experimentu nižší, vzorek RNA byl ředěn v poměru 1:1 s dH<sub>2</sub>O.

Injikovaný hermafrodit	Sledování potomci	Uhynulá embrya	Uhynulé larvy L1	Embryonální lethality (%)	Larvální lethality L1 (%)
1	117	89	1	76,07	0,85
2	183	107	5	58,47	2,73
3	207	147	13	71,00	6,28
4	95	59	1	62,10	1,05
5	154	75	8	48,70	5,19
6	161	66	17	40,99	10,56
7	144	64	9	44,44	6,25
8	200	103	14	51,50	7,00
9	138	42	21	30,43	15,22
10	126	44	19	34,92	15,08
11	175	60	19	34,29	10,86
12	173	64	16	36,99	9,25
13	127	48	7	37,80	5,51
	<b>Σ 2000</b>	<b>Σ 968</b>	<b>Σ 150</b>	<b>průměr 48,28</b>	<b>průměr 7,37</b>

Třetí experiment byl proveden s dsRNA *pha-4* v poměru 1:3 s dH<sub>2</sub>O. Z celkového počtu 14 injikovaných hermafroditů, kteří kladli potomky bylo pro výpočty použito 11 z nich. Celkové množství nakladených potomků bylo 1566. Embryonální lethality byla 29,87% a larvální lethality ve stádiu L1 byla 7,86% (Tab.11). Zhruba po 96 hodinách došlo k úhynu všech nevyvinutých larev, jejichž vývoj se zastavil ve stádiu L1.

Tab.11: Tabulka uvádí souhrn dat získaných během RNAi *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans* probíhající při teplotě 22°C. Koncentrace dsRNA byla v tomto experimentu nižší, vzorek RNA byl ředěn v poměru 1:3 s dH<sub>2</sub>O.

Injektivovaný hermafrodit	Sledování potomci	Uhynulá embrya	Uhynulé larvy L1	Embryonální lethality (%)	Larvální lethality L1 (%)
1	120	32	18	26,67	15,00
2	127	23	13	18,11	10,24
3	109	40	10	36,70	9,17
4	152	63	10	41,45	6,58
5	180	60	10	33,33	5,55
6	163	48	12	29,45	7,36
7	136	46	15	33,82	11,03
8	169	42	12	24,85	7,10
9	111	28	5	25,26	4,50
10	162	46	9	28,40	5,55
11	137	42	6	30,66	4,38
	<b>Σ 1566</b>	<b>Σ 470</b>	<b>Σ 120</b>	<b>průměr 29,87</b>	<b>průměr 7,86</b>

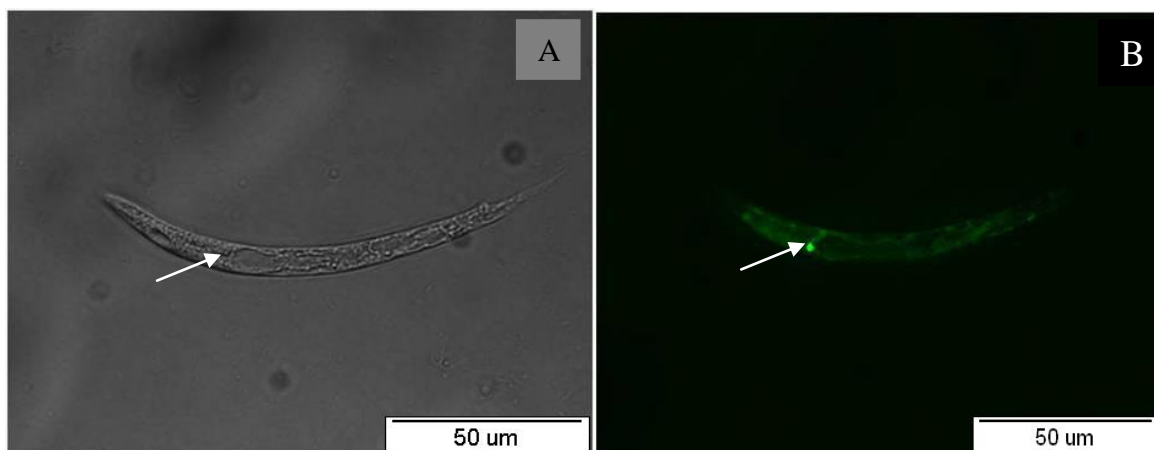
Hodnoty lethality se snižující se koncentrací RNA *pha-4* (1:1, *pha-4*: dH<sub>2</sub>O) zvyšují o 12% pro embryonální lethality a snižují o 2% pro larvální lethality oproti původní koncentraci RNA. Koncentrace RNA *pha-4* (1:3 *pha-4*: dH<sub>2</sub>O) snižena o 1/3, oproti původní koncentraci RNA, způsobuje snížení larvální lethality o 10% a embryonální lethality o 2%. Z výsledku tohoto experimentu vyplývá, že snížení koncentrace RNA použité pro mikroinjektivování nemá významný vliv na změnu lethality embryí, či larev *C. elegans*.

#### 4.5.4. Změny fenotypu a exprese *nhr-97* způsobené inhibicí *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans*

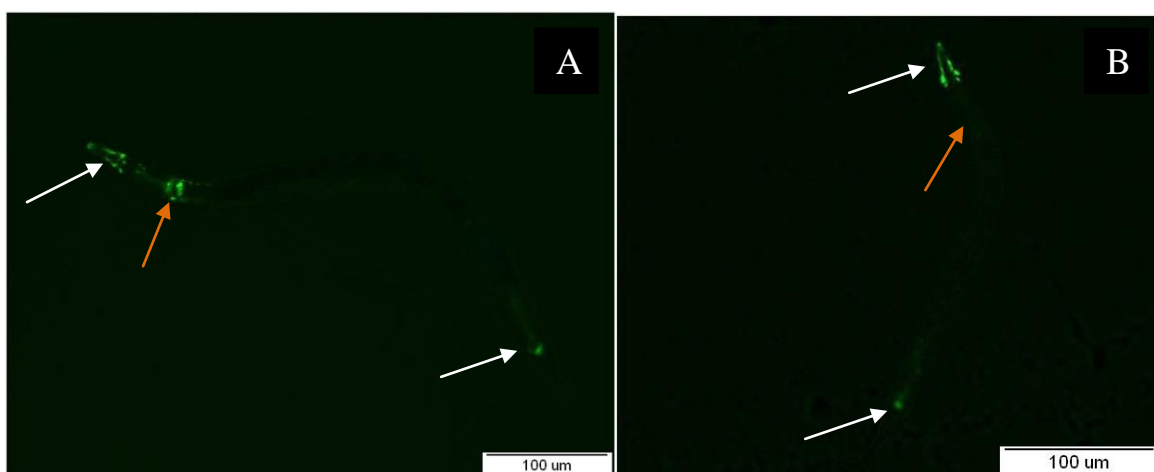
Během inhibice *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans* jsme zjistili, že dochází k embryonální (38%) a larvální lethality (8%) nematod po 12 hodinách od nakladení potomků hermafrodity. Většina larev se vyvine pouze do stádia L1 a po zhruba 96 hodinách umírají. Obrázek 41 zobrazuje uhynulou larvu L1, která má špatně vyvinutý hltan a k expresi *nhr-97* dochází pouze v neuronech okolo hltanu. Expres GFP, kterou vidíme v ostatních tkáních larvy je nespecifická a je způsobena degradací GFP po uhynutí larvy.

Podle našeho očekávání inhibicí *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP* P2B *C. elegans* dochází ke ztrátě exprese *nhr-97* v hltanu (Obr.42, 43, 44). Exprese *nhr-97* v ostatních tkáních linie zůstává zachována (Obr.42, 43, 44).

Z tohoto experimentu usuzujeme, že *pha-4* reguluje expresi *nhr-97* v hltanu *C. elegans*.

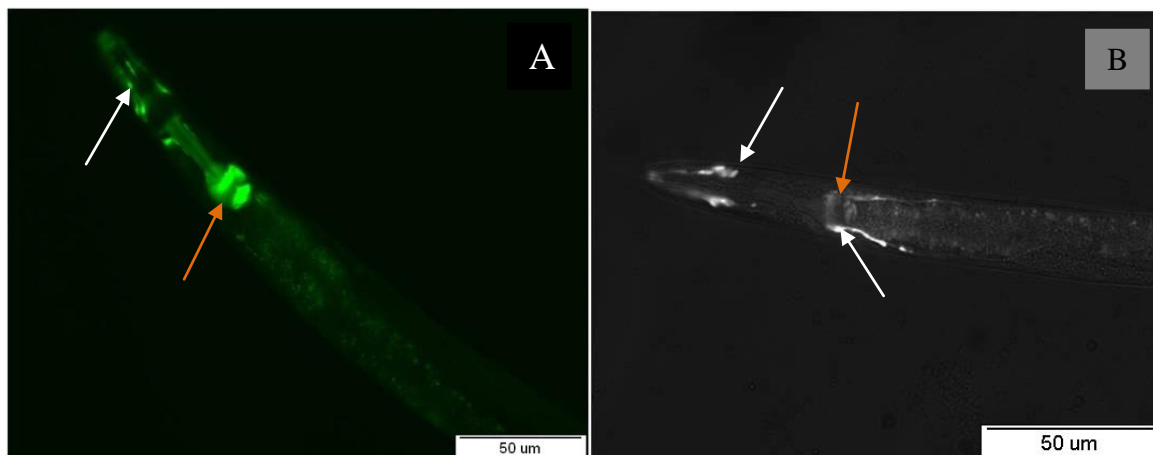


Obr.42: Uhynulá larva L1 s nesprávně vyvinutým hltanem (A, označena šipkou). Exprese *nhr-97* je viditelná pouze v neuronech okolo „hltanu“ (B, označena šipkou), k expresi v hltanu nedochází. Exprese GFP v ostatních tkáních je nespecifická a je způsobená degradací GFP po uhynutí larvy.



Obr.43: U dospělého jedince transgenní linie *nhr-97::GFP* P2B *C. elegans* (A) běžně sledujeme expresi *nhr-97* v hltanu (označuje oranžová šipka). U jedince *nhr-97::GFP* P2B s inhibovaným *pha-4* (B), který se vyvinul do dospělosti, expresi *nhr-97* v hltanu nepozorujeme (označuje oranžová šipka). Exprese *nhr-97* v neuronech v oblasti hltanu a v

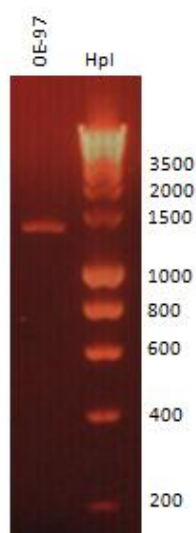
oblasti ocásku zůstává zachována (označují bílé šipky). Obr. A i B byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T.



Obr.44: Detailní pohled na hltan transgenní linie *nhr-97::GFP P2B C. elegans*. Výrazná exprese hltanu (A, označena oranžovou šipkou) se ztrácí po inhibici *pha-4* v této linii (B, označena oranžovou šipkou). Exprese zůstává v neuronech v okolí předního corpusu hltanu (A a B, označena šipkou vlevo) a v mezodermální hlavové buňce (B, označena šipkou vpravo). Obr. A byl fotografován pomocí UV lampy Olympus U-RFL-T, obr. B pomocí Nomarského hranolu.

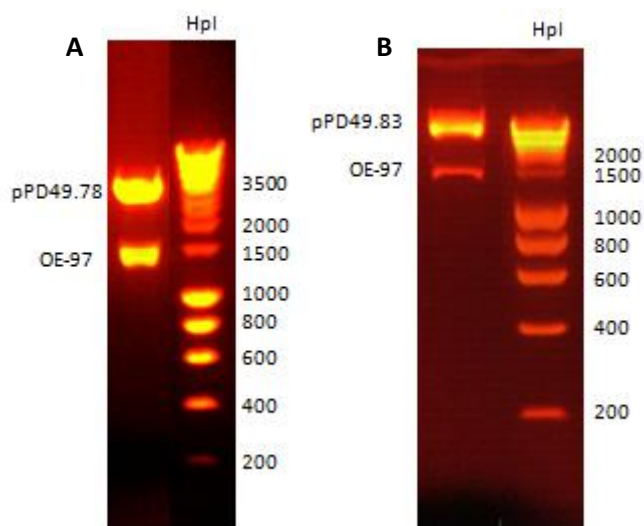
#### 4.6 Studium změn fenotypu *C. elegans* způsobených indukovanou expresí *nhr-97*

Navržený konstrukt cDNA pro indukovanou expresi *nhr-97* o délce 1327 bp (Obr.12) byl připraven z RNA izolované ze směsi stádií N2 *C. elegans*. cDNA byla použita pro amplifikaci navržené sekvence cDNA metodou PCR. Amplifikace produktu byla ověřena elektroforézou DNA na agarosovém gelu (Obr.45).



*Obr.45: Fragment cDNA nhr-97 isoformy A (1327 bp), navržený pro indukovanou expresi genu, po amplifikaci metodou PCR. Použitým standardem byl Hyper Ladder I.*

Amplifikovaná sekvence cDNA byla použita pro klonování do speciálních plasmidů pPD49.78 a pPD49.85 (Kap.3.1.3. Klonovací vektory) používaných pro studium indukované exprese genu. Pro ověření správného průběhu klonování fragmentu cDNA do plasmidů byla provedena elektroforéza DNA restriktčně štěpených produktů na agarosovém gelu (Obr.46) a sekvenování připraveného plasmidu.



*Obr.46: Fragment cDNA (1327 bp) nhr-97 isoformy A zaklonovaný do plasmidů pPD49.78 (A) a pPD49.83 (B). Použitým standardem byl Hyper Ladder I.*

Plasmidová DNA obsahující konstrukt cDNA *nhr-97* isoformy A o koncentraci 1 µg/µl byla injikována společně s plasmidem pRF4 o koncentraci 1 µg/µl do syncytia vaječníků mladého dospělého N2 hermafrodita. Následně byli hermafrodité kultivováni na Petriho miskách s OP50 při teplotě 22°C. Po třech dnech měli být vybráni transgenní potomci, kteří se „rolují“. Na miskách však nebyl nalezen žádný transgenní potomek, proto byly zvyšovány koncentrace DNA vektorů i pRF4 (koncentrace byla zvýšena na 2 µg/µl a poté i na 3 µg/µl u obou plasmidů). I přes zvýšení koncentrací DNA nebyli získáni žádní transgenní hermafrodité, proto nebylo možné provést indukovanou expresi *nhr-97* metodou tepelného šoku a studovat změny fenotypu *C. elegans*.

#### 4.7 Bioinformatická analýza aminokyselinové sekvence *nhr-97* s jeho paralogními receptory

Aminokyselinová sekvence receptoru *nhr-97* byla porovnána s jeho paralogními receptory za účelem charakterizace domény pro vazbu DNA (DBD) a P-box domény receptoru. Paralogní receptory k *nhr-97* byly vyhledány pomocí databáze BLAST na webových stránkách PubMed [74]. Těmito receptory jsou: *nhr-3*, *nhr-31*, *nhr-88*, *nhr-97* a *nhr-119*.

Porovnání aminokyselinových sekvencí receptorů ukazuje oblasti s velice podobnými aminokyselinovými sekvencemi a oblasti značně odlišné (Obr.47). Velmi podobné jsou sekvence DBD (podtržená žlutě) a poddomény zajišťující kontakt jaderného hormonálního receptoru s DNA vazebnými elementy (podtržená červeně). Domény pro vazbu ligandů, nacházející se většinou na C-terminálním konci receptoru, jsou často velmi odlišné. Analýza sekvencí aminokyselin byla provedena pomocí programu ClustalW2 [75].

Sekvence poddomény P-box byla určena jako CHGCKCFFWR. Vzhledem k tomu, že doména P-box je součástí proteinového motivu zinkového prstu (Obr.4), cysteiny v sekvenci vyznačené zeleně jsou aminokyseliny účastníci se koordinace kationtu zinku.

Aminokyseliny domény P-box označené modrou barvou CHGCKCFFWR se přímo váží na sekvenci AGGTCA, tzv. „core“ (vazné) místo uložené v regulační oblasti genu (Obr.5).

# SROVNÁNÍ AMINOKYSELINOVÝCH SEKVENCÍ NHR- 3, 31, 88, 97 a 119

nhr-31	MEQLDVEDWEYWGDEYLEEEPTYAIRPGTRVVKVERVPMRGDLRTSGATSSSGPATSYI	60
nhr-119	-----MGKVDTSSENMAASIS	17
nhr-97	-----MSGDAQSSNQATEA	16
nhr-88	-----MFAPSTVYTYGHHGSGT	17
nhr-3	-----MDTQSPFSFAAALLQCGSPGQTFMESLLK	31
	..	
nhr-31	IRPSDKQPTVSSGGSQNGDSVCAVCGD-GIAKLHYGVLACYGCKGFFRRILTGYRYACR	119
nhr-119	RKSSLSQIASHSGGSD---TCKVCGD-GNAKTHYGVVTCFGCKGFFRRILKRPSEYTCR	72
nhr-97	RPPSPPLVNEKAAIG---ALCVVCGDRACSHLYYGAACHGCKCFWRIVKSRLNVVCR	73
nhr-88	DEDDGQQVMPGMDNGD---GQCMVCGD-RSAGKHYGVMACYGCKGFFRRITRSQQTYTCR	73
nhr-3	PELGEYSPSGENGIDGEESTICSVCCD-EASGRHYGVVACFGCKGFFRRITVRAGKNVVC	90
	* * * * : : * * : * . * * * * * : : * . * *	
nhr-31	FSNNCIVDKFQRNSCRYCRFQRCIQAGMDPKAVRPDRDQTGKQKVPRIKKKQ-----	171
nhr-119	HNGHCVVDRHERNSCRFCRFKKCIEVGMDPKAVRPDRDATGRHYQGRQRRSK-----	124
nhr-97	YGGNCSISTAGRNACRYCRFHRCFLVGMKIEAVKMDRKLTKRK---KEKTDE-----	122
nhr-88	FTQKCAIDKDKQRNACRYCRFQRCITVGMPEAIRPDRDVIGKQKNPRKKMK-----	125
nhr-3	YSKKCRIDKAGRNVCSRFRQKCLEVGMPEDAIRPDRDKTGRQKNPRRNTSGSIKKVSVG	150
	. * : . * * * * * : : * . * * : : : .	
nhr-31	-----IDEELLNHMMRLQGDD-WSRKLFPVETRIILLQMLSIEDKVVKGDDNN	216
nhr-119	-----LSAEDE---GEVDAE-WMRKLFPVDMRTTLMQLLNIDLIVGGGDGH	165
nhr-97	-----DDTDDGGSHEFETTT-DAKRAKFDNSLLISSQLIDKTSSAGNAK	167
nhr-88	-----SDTNSGSIIDASLPSPNGCDSPVSNNEDVILSFLLDVEDQATCGNNH	171
nhr-3	SILGDLPLCLNKFDDSDDAATSPSSRADSPMDLRPSFIDESVLTTLTETENIVIQLQDN	210
	. : : * : : : :	
nhr-31	MSA---QNTAKDPKSIISLREMFESKPALDGRMEIGYEPFRMARTTELGVIAHRRRAIAA	272
nhr-119	TEP---SKIYPLPFATSIQRLLEDPTLLDGKRTMRYETFREINPDELPCIAHRRRIAM	221
nhr-97	LST---LHFVQP---SLQNLLEDPELLDGFSEMSYRATQADEQLCYDSERRIVTWA	219
nhr-88	ITMPIGISMMKNDFDFDVSTLFHSQYVRNQESFPITYAVGRTASVEQLIAALRRYVLSA	231
nhr-3	FET-----NQQLPPMGEAITKPSLIAARTLLNFNGAKGVADANCVSSNLRRMIVFT	262
	: : . : : *	
nhr-31	VDWVDSLTEIADAVDTEDKVALVKSCYSPLTIFNFS-ARTAQNTKNPDILCLCSHSFVPR	331
nhr-119	IDWADHLFDMMDVNNMDDKIAIVKASYGPLMIFSLC-ANTSR-HKMSDIVCLSTFGYISR	279
nhr-97	IDWCRQTAEIADVHHTNDKISLLRASCAPLVLLELG-CQSSFGPSDTQIPFCNNSFLSAH	278
nhr-88	VHWIDALFNLAHLTEIHDKTTLLKSVIGPFTIFNIA-ARTAQ-ISDGDILCLCNKSTINR	289
nhr-3	FDYINTLRPIADLHPS-EKLVIAHSIISPFILFCGYQSVAIETAEPEHDSIYLPSPGHKLPA	321
	.. : . * : : : . * : : : : : .	
nhr-31	RLPPEFNETNHLNLFID-----RTLNELVAPLRKLNKKEEIVPLKAIILNPNAK	383
nhr-119	YAPNGWAEPYHFGNQLAE-----RCIDELIDPLKMMNLKEEITLIKAIIVLNPYLK	331
nhr-97	CIP---PSTSFLRWKTIQ-----SLNKWAQRELKPLCLRAKEIVLLKALIALNPAN	327
nhr-88	QPARHLLDTNLVGNFVG-----RVIDDLVFPTKKLALTNPEITILSALIILDPDAR	341
nhr-3	SQLLFTKDSQKKYILLENKADNVRNMTMIIQQLRRLNVTKTEMVALKAIMALDHNVK	381
	.. : : : * . : : * : .	
nhr-31	GLSEHARHAISELKDVQDMLFQIVKEL-HPIYSASSRFGNLLLLLPTITTLGLMSSEN	442
nhr-119	TLTQDGSEAIMDLRDRIQETLYHVVRVET-HPKEVASSRFGNLLLFVPSVMMLGRIVTENL	390
nhr-97	GLSSDAESSIRMLRERVHTALFQLLMEN-SEPITAASRLAQILLIPQLSLMGVDVIEQV	386
nhr-88	GLSQETSQALLGIRDVQNALFNLIRDNSNNMTSVTSRFGNLLLFPPPLAKLSSLIGENV	401
nhr-3	GLSAESCCELLVVAESVQNALFSLHIAT-FGTAEATSRFAHLLLLIASATRVAYSLSSFF	440
	* : . : * : : * : : : * * : : * : .	

*Obr.47: Analýza aminokyselinových sekvencí odpovídajících pěti srovnávaným jaderným hormonálním receptorům: nhr-3, nhr-31, nhr-88, nhr-97 a nhr-119. Porovnání AMK sekvencí receptorů ukazuje oblasti s velice podobnými aminokyselinovými sekvencemi a oblasti značně odlišné. Velmi podobné jsou si sekvence DBD (podtržená žlutě) a poddomény P-box (podtržená hnědě). Domény pro vazbu ligandů, nacházející se většinou na C-terminálním konci receptoru, jsou velmi odlišné. Pro snazší rozlišení jsou aminokyseliny barevně označeny, červeně- malé a hydrofobní aminokyseliny, modře- kyselé aminokyseliny, růžově- aminokyseliny obsahující hydroxyl, zeleně- aminokyseliny s aminoskupinou, šedě- ostatní aminokyseliny. Vysvětlivky: \* poloha s identickými aminokyselinami, : / . poloha s aminokyselinami s významnou/méně významnou podobností, - delece v sekvenci. Analýza sekvencí AMK byla provedena pomocí programu ClustalW2 [75].*



## 5 Diskuze

Jaderné hormonální receptory (NHR) patří mezi transkripční faktory, které regulují širokou škálu procesů probíhajících během celého života *C. elegans*. Mezi tyto procesy patří například pohlavní determinace, vývoj jednotlivých stádií *C. elegans*, diapaúza a délka života. NHR mají také vliv na vývoj nervové soustavy a ovlivňují metabolismus lipidů a xenobiotik. Pro *C. elegans* bylo predikováno 284 jaderných receptorů, což je ve srovnání s *Drosophilou melanogaster* (18) a člověkem (48) neobvykle velké množství. Analýzou 15 NHR *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* a savců se zjistilo, že většina z nich má velmi podobnou strukturu s receptory ostatních analyzovaných živočichů [1]. Skupina 269 doplňkových jaderných receptorů *C. elegans* vznikla expanzí z evolučního předchůdce genu, který kóduje protein HNF4 [9]. Tento fakt naznačuje, že expanze doplňkových jaderných receptorů v *C. elegans* reflektuje překlenutí metabolické potřeby vypořádání se s množstvím různých xenobiotik, se kterými se hlístice setkává v půdním prostředí [77].

Mapování exprese a funkce NHR u *C. elegans* patří v dnešní době mezi aktuální témata. V roce 2007 provedl vědecký tým, v čele s Hunt-Newbury [78], rozsáhlou studii exprese genů specifických pro *C. elegans*. Část z těchto genů patřila také do skupiny NHR. S použitím zeleného fluorescenčního proteinu provedli analýzu 5' sekvencí DNA regulujících expresi genů ve všech vývojových stádiích od embrya až po dospělého jedince [78]. Přesto expresi a funkci jaderného hormonálního receptoru *nhr-97* do této doby nikdo nepopsal. Proto jsme se rozhodli studovat tento jaderný receptor z důvodu rozšíření informací o doplňkových jaderných receptorech u *C. elegans*.

V bakalářské práci jsme zjistili, že gen *nhr-97* má dvě isoformy označované jako A a B [45]. Pro každou isoformu jsme navrhli a připravili několik různě dlouhých sekvencí jejich promotorů a studovali jsme, jak regulují expresi *nhr-97* (Obr.9). První dvě sekvence označené PA (isoforma A) a PB (isoforma B), které byly připraveny již v bakalářské práci [45] byly navrženy o délce sekvence zhruba 2000 bp. Sekvence promotoru pro studium exprese genu o délce cca 2000 bp bývá standardně používána pro navržení prvních promotorů. Zároveň sekvence PA obsahovala 1. exon isoformy A a sekvence PB1. a 2. exon isoformy B *nhr-97*.

Proto, že jsme v transgenní linii *nhr-97::GFP* PA *C. elegans*, připravené mikroinjekcí plasmidu obsahující promotor PA, zjistili expresi *nhr-97::GFP* navrhli jsme další dva promotory P2A (637 bp) a P3A (288 bp) o kratších sekvencích (Obr. 9A), abychom zjistili nejkratší sekvenci promotoru, která reguluje expresi isoformy A *nhr-97*. Promotory P2A a P3A již 1. exon isoformy A *nhr-97* neobsahují. Vzhledem k tomu, že u transgenní linie *nhr-97::GFP* P2A exprese *nhr-97* zjištěna byla, ale u linie *nhr-97::GFP* P3A se již exprese *nhr-97::GFP* nevyskytovala, prokázali jsme, že promotor regulující isoformu A genu *nhr-97* má nejkratší funkční sekvenci o délce mezi 640 – 300 bp.

Naopak v transgenní linii *nhr-97::GFP* PB jsme nezjistili expresi *nhr-97*, proto jsme navrhli promotor P2B o sekvenci dvakrát delší (4162 bp), který stejně jako promotor PB obsahoval 1. a 2. exon isoformy B genu (Obr.9B). Tento promotor obsahuje zároveň 1. a 2. exon isoformy A a zasahuje i do její promotorové oblasti. V transgenní linii *nhr-97::GFP* P2B byla lokalizována exprese *nhr-97*, proto je do budoucna plánováno připravit promotor pro isoformu B, který nezasahuje do promotorové oblasti isoformy A *nhr-97* a zjistit zda dochází k expresi *nhr-97* v transgenní linii připravené z tohoto promotoru.

V případě *nhr-97* jsme u isoform A a B zjistili odlišnou expresi *nhr-97::GFP* v tkáních *C. elegans*. V transgenních liniích *nhr-97::GFP* PA a *nhr-97::GFP* P2A připravených pro studium exprese isoformy A *nhr-97* jsme expresi detekovali v neuronech v oblasti hltanu a v neuronech v oblasti ocásku, ve střevě a v hypodermis. Zatímco u transgenní linie *nhr-97::GFP* P2B jsme expresi detekovali především v hltanu, v hlavové mesodermální buňce, v neuronech v oblasti hltanu a v análním svěrači. Tento výsledek naznačuje odlišnou funkci isoform A a B genu *nhr-97* u *C. elegans*. Rozdíl v expresi *nhr-97::GFP* jsme pozorovali i u linií připravených pro studium isoformy A *nhr-97*. V transgenní linii *nhr-97::GFP* PA jsme zjistili expresi *nhr-97* v neuronech ocásku, zatímco v *nhr-97::GFP* P2A linii jsme tuto expresi nedetekovali, u této linie jsme však zjistili silnější expresi v distální části střeva *C. elegans*. V transgenních liniích *nhr-97::GFP* P3A a *nhr-97::GFP* PB *C. elegans* exprese *nhr-97* detekována nebyla, pravděpodobně z důvodu navržení příliš krátkých sekvencí promotorů daných isoformem.

Exprese mRNA *nhr-97* během vývoje *C. elegans* byla ověřena pomocí kvantitativní PCR. Z výsledků vyplývá, že exprese isoformy A i isoformem A+B *nhr-97* je nejvyšší u larválních stádií L1 a L2 a nejnižší u embryí. Vzhledem k tomu, že hodnoty exprese mRNA pro

isoformu A a isoformy A+B jsou ve všech stádiích přibližně stejné a hodnoty směrodatných odchylek jsou nízké, můžeme říci, že jednotlivá měření proběhla s vysokou přesností a exprese mRNA *nhr-97* isoformy A a A+B v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans* je stejná.

Na základě lokalizace exprese *nhr-97* v tkáních *C. elegans* a změřením exprese mRNA *nhr-97* metodou qPCR jsme zjistili, že gen *nhr-97* je exprimován ve všech vývojových stádiích od embryí až po dospělé hermafrodity a intenzita exprese v těchto stádiích je stejná. Můžeme proto říci, že *nhr-97* reguluje pochody probíhající v těle hlístice během celého jejího života.

Funkci *nhr-97* jsme studovali pomocí inhibice tohoto genu *in vivo* v *C. elegans* metodou RNA interference. Zjistili jsme pouze 9% embryonální lethality, larvální lethality *C. elegans* jsme nezjistili žádnou. Vzhledem k tomu, že inhibice *nhr-97* nevyvolala žádné výrazné časové změny vývoje nematod, změny fenotypu ani lethality embryí, či larev, můžeme na základě tohoto výsledku interpretovat dvě možné teorie ohledně funkce *nhr-97*: 1) *Nhr-97* je jako transkripční faktor závislý na kooperaci s jiným (jinými) dalšími transkripčními faktory. 2) Inhibice tohoto jaderného receptoru je substituována jiným receptorem, který zastupuje jeho funkci. Důvodem proč jsme nezjistili žádné změny u *C. elegans* během RNAi může být i to, že RNAi není schopná zcela eliminovat mRNA exprimovanou v buňkách, zejména u genů exprimovaných v pozdních stádiích embryogeneze nebo v larválních stádiích [77].

Je známo, že exprese některých jaderných hormonálních receptorů je regulována jinými transkripčními faktory. Jedním z nich je gen *pha-4* (z *angl.* pharynx defective-4) patřící do skupiny FoxA proteinů. Předpokládá se, že většina, možná všechny geny exprimované v buňkách hlitanu a v různých vývojových stádiích *C. elegans* jsou aktivovány přímo transkripčním faktorem *pha-4* [40]. Pro DNA vazebnou doménu *pha-4* je známo několik vazebných sekvencí v promotorech regulovaných genů, jednou z nich je sekvence TGTTTGC [35]. Tuto vazebnou sekvenci jsme hledali v promotorech obou isoform A i B *nhr-97* *C. elegans*, ale našli jsme ji pouze u isoformy B. Pomocí metody RNAi jsme se rozhodli zjistit, zda je transkripce *nhr-97* regulována genem *pha-4*/FoxA. Pro tento experiment jsme si vybrali transgenní linii *nhr-97::GFP* P2B, ve které je exprese *nhr-97* v hlitanu velmi silná, a gen *pha-4*, který se podílí na regulaci vývoje hlitanu *C. elegans*.

Transkripční faktor *pha-4*/FoxA je nezbytný pro vývoj hltanu a střeva v raném stádiu embryogeneze *C. elegans*. Pokud je tento transkripční faktor inhibován v živém organismu dojde k zastavení vývoje *C. elegans* v pozdním embryonálním stádiu, či larválním stádiu L1. Ve stádiu embryonálního vývoje *C. elegans* označovaném jako stádium trojího ohnutí je již zformována většina anatomických struktur včetně hltanu a trávicí trubice. Z tohoto důvodu vylíhnutí jedinci s defektem hltanu, kteří nemohou přijímat potravu zůstávají ve stádiu L1 několik dní a poté umírají [37, 38, 39]. Růst a vývoj hltanu *C. elegans* závisí na koordinaci exprese genů zprostředkovaných *pha-4* v kombinaci s dalšími, většinou neznámými, transkripčními faktory. Důkazem, že exprese jaderných hormonálních receptorů působících v hltanu je regulována *pha-4*, je gen ovlivňující vývoj svalů hltanu *daf-12/NHR* [40].

Vzhledem k tomu, že jsme objevili vazebnou sekvenci pro vazebnou doménu DNA *pha-4* v promotorové oblasti isoformy B, získali jsme předpoklad pro to, že exprese *nhr-97* je regulována genem *pha-4*. Tento předpoklad jsme ověřili metodou RNAi, kdy jsme inhibovali funkci *pha-4* v transgenní linii *nhr-97::GFP* P2B (u této linie byla zjištěna silná exprese *nhr-97* v hltanu). Inhibicí *pha-4* v této transgenní linii jsme získali hermafrodity bez exprese *nhr-97::GFP* v hltanu (exprese v ostatních tkáních zůstala zachována). Pokud tedy umlčíme expresi *pha-4*, nedochází k expresi *nhr-97* v hltanu. Výsledky experimentu potvrdili náš předpoklad, že transkripční faktor *pha-4* reguluje expresi *nhr-97*. Zajímavým faktem je, že vazebná doména DNA pro *pha-4* nebyla nalezena v promotorové oblasti isoformy A *nhr-97*. S tímto zjištěním koreluje i absence exprese *nhr-97::GFP* v hltanu transgenních linií připravených pro studium exprese isoformy A *nhr-97*. Z výsledků vyplývá, že *pha-4* reguluje expresi pouze isoformy B *nhr-97* a tímto byla potvrzena i samostatná funkce isoformy B *nhr-97*.

Změny fenotypu organismu metodou indukované exprese *nhr-97* nebyly pozorovány z toho důvodu, že se nám nepodařilo připravit transgenní potomky hermafroditů injikovaných plasmidy připravenými pro tento experiment. Injekování mladých dospělých hermafroditů bylo provedeno pětkrát, pokaždé se zvýšenou koncentrací plasmidů pRF4 a pPD49.78 (pPD49.83). Avšak rolující se potomek, který indikuje transgenního jedince, nebyl nikdy nalezen. Důvodem by mohla být například inhibice exprese konstruktů v *C. elegans*. Příčinu neúspěchu u této metody si však přesně vysvětlit nedokážeme.

Charakterizace genu zahrnovala také stanovení a zařazení sekvence domény P-box receptoru do skupiny receptorů se stejnou, či podobnou strukturou této domény. Doména P-box *nhr-97* má aminokyselinovou sekvenci CHGCKCFFWR. Tato sekvence je zařazena do I. třídy NHR *C. elegans* dle Van Gilsta (viz. Tab.1), [7]. Sekvence a struktura genu, včetně první rozsáhlé intronové oblasti, je v nematodech evolučně konzervovaná. V dnešní době je předpovězeno 284 NHR *C.elegans*, my jsme provedli srovnání aminokyselinových sekvencí receptorů, které jsou paralogní k *nhr-97*: *nhr-3*, *nhr-31*, *nhr-88* a *nhr-119*. Doména pro vazbu DNA je u NHR vysoce konzervovaná, což se projevuje její podobností s ostatními paralogy. Doména pro vazbu ligandu nacházející se až za DBD je však velmi variabilní a specifická pro každý receptor [19, 22].

## 6 Závěr

V této diplomové práci jsme se zabývali jaderným hormonálním receptorem *nhr-97*, který patří mezi doplňkové jaderné receptory *C. elegans* a jeho exprese a funkce dosud nebyly studovány.

*Nhr-97* je *C. elegans* exprimován ve dvou isoformách, které označujeme jako A a B.

Expresi jaderného receptoru *nhr-97* byla studována pomocí několika transgenních linií, které byly připraveny mikroinjekcemi plasmidů obsahujících navržené promotory isoform A (PA, P2A, P3A) a B (PB, P2B).

V transgenní linii *nhr-97::GFP PA C. elegans* jsme expresi *nhr-97::GFP* detekovali v buňkách neuronů v oblasti hltanu, v neuronech ocásku, ve střevě a v hypodermis. Expresi *nhr-97* transgenní linie *nhr-97::GFP P2A* byla detekována ve stejných tkáních, avšak nebyla detekována v neuronech v oblasti hlavy. Expresi *nhr-97::GFP* isoformy A je v embryu ubikvitní ve všech jeho buňkách a během vývoje organismu je detekována v popsanych tkáních od larválního stádia L1 až po dospělého jedince. V transgenní linii *nhr-97::GFP P3A C. elegans* exprese *nhr-97::GFP* detekována nebyla.

V transgenní linii *nhr-97::GFP P2B C. elegans* jsme detekovali expresi *nhr-97::GFP* v hltanu, a to především v isthmu a v druhé zaoblené části hltanu, v neuronech okolo korpusu, v análním svěrači a v hlavové mesodermální buňce. Expresi *nhr-97::GFP* v embryu zjištěna nebyla, avšak od larválního stádia L1 dochází k expresi v hltanu, v neuronech v oblasti hltanu a ocásku a u dospělého jedince se exprese vyskytuje navíc v hlavové mesodermální buňce. V transgenní linii *nhr-97::GFP PB C. elegans* exprese *nhr-97::GFP* detekována nebyla.

Pomocí kvantitativní PCR jsme ověřili expresi mRNA *nhr-97* ve všech vývojových stádiích *C. elegans*. Zjistili jsme, že k expresi *nhr-97* isoformy A i B na transkripční úrovni dochází ve všech vývojových stádiích a je zhruba stejně intenzivní, nejnížší je však u embryí a nejvyšší u larválního stádia L1 a L2.

Inhibicí *nhr-97* na posttranskripční úrovni metodou RNA interference jsme zjistili 9% embryonální letalitu bez fenotypových změn larev či změny vývoje nematod v čase.

Pomocí bioinformatických metod jsme v promotorové oblasti isoformy B *nhr-97* našli vazebnou sekvenci TGTTCG pro transkripční faktor *pha-4*. Inhibicí *pha-4* na posttranskripční úrovni metodou RNA interference v transgenní linii *nhr-97::GFP* P2B jsme zjistili 38% embryonální letalitu a 8% larvální letalitu. Zároveň docházelo ke ztrátě exprese *nhr-97::GFP* v hltanu. Transgenní linie *nhr-97::GFP* P2B byla pro tento experiment vybrána z důvodu silné exprese *nhr-97::GFP* v hltanu *C. elegans*. Gen *pha-4* byl vybrán pro tento experiment proto, že většina, možná všechny geny exprimované v různých typech buněk hltanu *C. elegans* jsou aktivovány přímo *pha-4*. Naše výsledky potvrdily, že *pha-4* reguluje expresi *nhr-97* v hltanu *C. elegans*.

Změny fenotypu organismu metodou indukované exprese *nhr-97* nebyly pozorovány z toho důvodu, že se nám nepodařilo připravit transgenní potomky hermafroditů injikovaných plasmidy připravenými pro tento experiment.

Analýzou aminokyselinových sekvencí příbuzných receptorů s receptorem *nhr-97* bioinformatickými metodami jsme ověřili zachovanost struktury proteinu v oblasti domény pro vazbu DNA. Nalezli jsme aminokyselinovou sekvenci poddomény domény P-box CHGCKCFFWR, která se přímo účastní vazby s DNA.

## 7 Seznam použitých zkratek

A	<i>z angl.</i> adult, dospělý jedinec <i>C. elegans</i>
AK	aminokyselina
Amp	ampicilin
AP	<i>z angl.</i> alkaline phosphatase, alkalická fosfatáza
bp	<i>z angl.</i> base pair, párů bází
BSA	<i>z angl.</i> bovine Serum Albumin, hovězí sérový albumin
cDNA	<i>z angl.</i> complementary DNA, komplementární DNA
Cys	cystein
CTE	<i>z angl.</i> C-terminal extension, C-terminální prodloužení
DBD	<i>z angl.</i> DNA binding domain, doména vážící DNA
DNA	<i>z angl.</i> deoxyribonucleotide acid, deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	<i>z angl.</i> deoxynucleotidetriphosphate, deoxynukleotidtrifosfát
dsRNA	<i>z angl.</i> double stranded RNA, dvouvláknová RNA
E	embryo <i>C. elegans</i>
Fox	<i>z angl.</i> forkhead box
FoxA	transkripční protein patřící do rodiny FOX proteinů (viz. Fox)
FoxR	transkripční protein patřící do rodiny FOX proteinů (viz. Fox)
gDNA	genomická DNA
GFP	<i>z angl.</i> green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
HBI	4-(p-hydroxybenzylidin) imidazolidin-5-on
His	histidin
HNF4	<i>z angl.</i> hepatocyte nuclear factor 4, hepatocytární jaderný faktor 4
HREs	<i>z angl.</i> hormone response elements, elementy hormonální odezvy



HSE	<i>z angl.</i> heat shock response element, elementy odezvy tepelných šoků
HS	<i>z angl.</i> promoter of heat shock, promotor reagující na teplotní šok
NHR	<i>z angl.</i> nuclear hormone receptors, jaderné hormonální receptory
<i>nhr-97</i>	<i>z angl.</i> nuclear hormone receptor 97
Kap.	kapitola
kbp	<i>z angl.</i> kilo base pair, kilo párů bází
LBD	<i>z angl.</i> ligand binding domain, doména vážící ligand
L1	larvální stádium L1 <i>C. elegans</i>
L2	larvální stádium L2 <i>C. elegans</i>
L3	larvální stádium L3 <i>C. elegans</i>
L4	larvální stádium L4 <i>C. elegans</i>
NGM	<i>z angl.</i> nematode grow medium, růstové medium pro kultivaci nematod
NR	<i>z angl.</i> nuclear receptors, jaderné receptory
N2	divoký typ <i>C. elegans</i> vyskytující se volně v přírodě
qPCR	<i>z angl.</i> quantitative PCR, kvantitativní PCR
PCR	<i>z angl.</i> polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
<i>pha-4</i>	<i>z angl.</i> pharynx defective 4
RNA	<i>z angl.</i> ribonucleotide acid, deoxyribonukleotidová kyselina
RNAi	RNA interference
rpm	<i>z angl.</i> revolutions per minute, otáčky za minutu
ssRNA	<i>z angl.</i> single stranded RNA, jednovláknová RNA
SupNRs	<i>z angl.</i> supplementary nuclear receptors, doplňkové jaderné receptory
TBP	<i>z angl.</i> TATA-box binding protein, TATA-box vážící protein

## 8 Literatura

- [1] Antebi, A.: Nuclear hormone receptors in *C. elegans*. *Wormbook* **2006**. [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_nuclearhormonerecep/nuclearhormonerecep.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_nuclearhormonerecep/nuclearhormonerecep.html) (citováno dne 20.7.2012).
- [2] Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Cahmbon P.; Evans, R. M.; The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* **1995**, 83, 835-839.
- [3] Glass, C. K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocrinol. Rev.* **1994**, 15, 391-407.
- [4] Horowitz, K.B.; Jakson, T. A.; Bain, D.L.; Richer, J.K.; Takimoto, G. S.; Lung, T.; Nuclear receptor coactivators a corepressors. *Mol. Endocrinol.* **1996**, 10, 1167-1177.
- [5] Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G. Steroid hormone receptor: many actors in search of a plot. *Cell* **1995**, 83, 851-857.
- [6] Robyr, D.; Wolffe, A. P.; Wahli, W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol. Endocrinol.* **2000**, 14, 329-347.
- [7] Gilst, V. M.; Gissendanner, Ch. R.; Sluder, A. E. Diversity and function of orphan nuclear receptors in nematodes. *Crit. Rev. Eukar. Gene* **2002**, 12, 65-88.
- [8] Kostrouchova, M.; Krause, M.; Kostrouch, Z.; Rall, J. E.; CHR3: a *Caenorhabditis elegans* orphan nuclear hormone receptor required for proper epidermal development and molting. *Development* **1998**, 125, 1617-1626.
- [9] Robinson-Rechavi, M.; Maina, C. V.; Gissendanner, C. R.; Laudet, V.; Sluder, A.; Explosive lineage- specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes. *J. Mol. Evol.* **2005**, 60, 577-586.
- [10] Gissendanner, C. R.; Crossgrove, K.; Kraus, K. A.; Maina, C. V.; Sluder, A.E.; Expression and function of conserved nuclear receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **2004**, 266, 399-416.
- [11] Alberts, B.; Bray, D.; Johnason, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Molecular biology of the cell. *Garland Publishing, Inc.* **1994** str. 257-273.
- [12] Snustad, D.; Simmons, M.J.; Relichová, J.; Doškař, J.; Fajkus, J.; Hořín, P.; Knoll, A.; Kuglík, A.; Šmarda, J.; Šmardová, J.; Veselská, R.; Vyskot, B. Genetika. Vyd. 1. Brno : Masarykova univerzita, **2009**. 894 s. Učebnice. Český překlad učebnice. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [13] Obr.1 a 4 převzat z: Aranda, A.; Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 1269-1304.

- [14] Moore, M.; Ulman, Ch. Recent developments in the engineering of zinc finger proteins. *Henry Stewart Publications* **2003**, 1, 342–355.
- [15] Miller, J.; McLachlan, A. D.; Klug, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **1985**, 4, 1609–1614.
- [16] Obr.2 převzat 9.2.2012 z:  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zinc\\_finger\\_rendered.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zinc_finger_rendered.png)
- [17] Landschulz, W. H.; Johnson, P. F.; McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **1988**, 240, 1759–1764.
- [18] Giguere, V.; Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrinol. Rev.* **1999**, 20, 689–725.
- [19] Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M.; The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **1995**, 83, 841–850.
- [20] Kittnar, O. a kolektiv. *Lékařská fyziologie*; str. 43; Grada Publishing: Praha, **2011**.
- [21] Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 384–390.
- [22] Jensen, E. V.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, E. W.; Jungblut, P. W.; DeSombre, E. R. A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1968**, 59, 632–638.
- [23] Escriva, H.; Delaunay, F.; Laudet, V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays* **2000**, 22, 717–727.
- [24] Laudet, V.; Gronemeyer, H. *The nuclear receptors factsbook*. London: Academic Press, **2002**.
- [25] Park, J. I.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J.; Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promotor- transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J. Med.* **2003**, 52, 174–181.
- [26] Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptors. *J. Mol. Endocrinol.* **1997**, 19, 207–226.
- [27] Brožová, E.; Šimečková, K.; Kostrouch, Z.; Rall, J. E.; Kostrouchová, M. NHR-40 a *Caenorhabditis elegans* supplementary nuclear receptor, regulates embryonic and early larval development. *Mech. Dev.* **2006**, 123, 689–701.
- [28] Asahina, M.; Ishihara, T.; Jindra, M.; Kohara, I.; Hirose, S.; The conserved nuclear receptor Ftz-F1 is required for embryogenesis, molting and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* **2000** 5, 711–723.

- [29] Kostrouchova, M.; Krause, M.; Kostrouch, Z.; Rall, J. E.; Nuclear hormone receptor CHR3 is a critical regulator of all four larval molts of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 7360-7365.
- [30] Much, J. W.; Slade, D. J.; Klampert, K.; Garriga, G.; Wightman, B. The fax-1 nuclear hormone receptor regulates axon pathfinding and neurotransmitter expression. *Development (U.K.)* **2000**, 127, 703–712.
- [31] Zhou, H. M.; Walthall, W. W. UNC-55, an orphan nuclear hormone receptor, orchestrates synaptic specificity among two classes of motor neurons in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **1998**, 18, 10438–10444.
- [32] Carmi, I.; Kopczynski, J. B.; Meyer, B. J.; The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. *Nature* **1998**, 396, 168-173.
- [33] Carter, M. E.; Brunet, A. FOXO transcription factors. *Curr. Biol.* **2007**, 17, R113–R114.
- [34] Weigel, D.; Jürgens, G.; Küttner, F.; Seifert, E.; Jäckle, H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* **1989**, 57, 645–658.
- [35] Raharjo, W. H.; Logan, B. C.; Wen, S.; Kalb, J. M.; Gaudet, J. In vitro and in vivo characterization of *Caenorhabditis elegans* PHA-4/FoxA response elements. *Dev. Dynam.* **2010**, 239, 2219–2232.
- [36] Panowski, S.; Wolff, S.; Aguilaniu, H.; Durieux, J.; Dillin, A. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* **2007**, 447, 550–555.
- [37] Horner, M. A.; Quintin, S.; Domeier, M. E.; Kimble, J.; Labouesse, M.; Mango, S. E. *pha-4*, an HNF-3 homolog, specifies pharyngeal organ identity in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **1998**, 12, 1947–1952.
- [38] Ao, W.; Gaudet, J.; Kent, W. J.; Muttumu, S.; Mango, S. E. Environmentally induced foregut remodeling by PHA-4/FoxA and DAF-12/NHR. *Science* **2004**, 305, 1743–1746.
- [39] Mango, S. E.; Lambie, E. J.; Kimble, J. The *pha-4* gene is required to generate the pharyngeal primordium of *Caenorhabditis elegans*. *Development* **1994**, 120, 3019–3031.
- [40] Ao, W.; Gaudet, J.; Kent, W. J.; Muttumu, S.; Mango, S. E. Environmentally induced foregut remodeling by PHA-4/FoxA and DAF-12/NHR. *Science* **2004**, 305, 1743–1746.
- [41] Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, 77, 71-94.
- [42] Riddle, D.L. *C. elegans* II: The biological model, 1st ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, **1997**.

- [43] Depee, U.; Schierenberg, E.; Cole, T.; Krieg, C.; Schmitt, D.; Yoder, B.; Ehrenstein, G. Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 376-380.
- [44] Hope, I.A. *C. elegans*, A practical approach: background on *Caenorhabditis elegans*, Life cycle. Oxford University Press: New York, **1999**.
- [45] Boušová, K. Příprava konstruktů pro analýzu jaderného hormonálního receptoru *nhr-97* pomocí transgenních technik v modelovém systému *C. elegans*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, 14.9.**2010**.
- [46] Šimečková, K. Nuclear hormone receptors in *Caenorhabditis elegans*: NHR-60 regulates embryonic development. Ph.D. thesis, Charles University in Prague, **2008**.
- [47] Altun, Z.F.; Hall, D.H.; Introduction to *C. elegans* anatomy. *WormAtlas* **2008**. <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.html> (citováno dne 20.7.2012).
- [48] Obr. 7 převzat 14.2.2012 z:  
<http://wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig1leg.htm>
- [49] Altun, Z.F. and Hall, D.H. Epithelial system, hypodermis. *WormAtlas* **2009**.  
<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hypodermis/Hypframeset.html> (citováno dne 20.7.2012).
- [50] Altun, Z. F.; Hall, D. H. Nervous system, general description. *WormAtlas* **2011**.  
<http://wormatlas.org/hermaphrodite/nervous/Neuroframeset.html> (citováno dne 20.7.2012).
- [51] Durbin, R. M. Studies on the development and organisation of the nervous system of *C. elegans*. Ph.D. thesis 1987, University of Cambridge, United Kingdom.
- [52] Altun, Z. F.; Hall, D. H. Muscle system, introduction. *WormAtlas* **2009**.  
<http://wormatlas.org/hermaphrodite/muscleintro/MusIntroframeset.html> (citováno dne 20.7.2012).
- [53] Altun, Z.F. and Hall, D.H. Muscle system, head mesodermal cell. *WormAtlas* **2009**.  
<http://wormatlas.org/hermaphrodite/muscleheadcell/Mushmcframeset.html> (citováno dne 20.7.2012).
- [54] Altun, Z. F.; Hall, D. H. Alimentary system, pharynx.. *WormAtlas* **2009**.  
<http://wormatlas.org/hermaphrodite/pharynx/Phaframeset.html> (citováno dne 20.7.2012).
- [55] Altun, Z. F.; Hall, D. H. Alimentary system, intestine. *WormAtlas* **2009**.  
<http://wormatlas.org/hermaphrodite/intestine/Intframeset.html> (citováno dne 20.7.2012).
- [56] The *C. elegans* Sequencing Consortium; Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **1998**, *282*, 2012-2018.

- [57] Blumenthal, T.; Evans, D.; Link, C.; Guffanti, A.; Lawson, D.; Thierry-Mieg, J.; Thierry-Mieg, D.; Chiu, W.; Duke, K.; Kiraly, M.; Kim, S.; A global analysis of *Caenorhabditis elegans* operons. *Nature* **2002**, 417, 851-854.
- [58] Spieth, J.; Lawson, D.; Overview of gene structure. *Wormbook* **2006** [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_overviewgenestructure/overviewgenestructure.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_overviewgenestructure/overviewgenestructure.html) (citováno dne 20.7.2012).
- [59] Albertson, D. G.; Thomson, J. N.; The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* **1982**, 86, 409-428.
- [60] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C.; Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994**, 263, 802-805.
- [61] Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y.; Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Cell Comp Physiol.* **1962**, 59, 223-239.
- [62] Ormo, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **1996**, 273, 1392-1395.
- [63] Tsien, R. Y.; The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544.
- [64] Yang, F.; Moss, L. G.; Phillips, Jr., G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **1996**, 14, 1246-1251.
- [65] Phillips, G.; Green fluorescent protein - a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, 204, 9-18.
- [66] Obr. 8 převzat 15.2.2012 z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Green\\_fluorescent\\_protein](http://en.wikipedia.org/wiki/Green_fluorescent_protein)
- [67] Prendergast, F. G.; Mann, K. G. Chemical and physical properties of Aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskileia*. *Biochemistry* **1978**, 17, 3448-3453.
- [68] Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Wintant, J.; Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **1974**, 13, 2656-2662.
- [69] "The Nobel Prize in Chemistry 2008". Nobelprize.org. 16 Feb 2012 [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/index.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/index.html) (ztazeno dne 20.7.2012).
- [70] Yuste, R. Fluorescence microscopy today. *Nature Methods* **2005**, 2, 902-904.
- [71] Gather, M. C.; Yun, S. H. Single-cell biological lasers. *Nature Photonics* **2011**, 5, 406-410.

- [72] Citováno dne 29.5.2012:  
<http://legacy.wormbase.org/db/gene/gene?name=WBGene00003687;class=Gene>
- [73] Citováno dne 23.5.2012:  
[http://www.wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/WBGene00000123?query=ama-1#081c-9e3-10](http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00000123?query=ama-1#081c-9e3-10)
- [74] Citováno dne 29.5.2012:  
[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST\\_PROGRAMS=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)
- [75] Citováno dne 29.5.2012: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- [76] Citováno dne 5.6.2012: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- [77] Brožová, K. Nuclear receptors in *Caenorhabditis elegans*: NHR-40 regulates embryonic and larval development. Ph.D. thesis, Charles University 1st Faculty of Medicine Institute of Inherited Metabolic Disorders, Prague **2006**.
- [78] Hunt-Newbury, R.; Viveiros, R.; Johnsen, R.; Mah, A.; Anastis, D.; et al. High-throughput in vivo analysis of gene expression in *caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* **2007**, 5 (9) e237.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

[illegible]